



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Caracterização material e microbiológica de
espécimes fotográficos**

Margarida Ribeiro Mota Padeira Nunes

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Caracterização material e microbiológica de
espécimes fotográficos**

Margarida Ribeiro Mota Padeira Nunes

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2016

Gostaria de expressar o meu profundo apreço e agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram e apoiaram durante este projeto.

À Professora Teresa Ferreira, orientadora da dissertação, um enorme obrigada, pela partilha do saber, pela valiosa contribuição e pelo apoio e entusiasmo que se revelaram fundamentais para a minha própria motivação. Obrigada por me acompanhar nesta jornada e despertar em mim o interesse pela vida académica. Agradeço também à coorientadora, Professora Ana Teresa Caldeira pela disponibilidade, orientação e incentivo.

Um muito obrigada às técnicas do Laboratório de Biotecnologia, D. Helena e D. Esperança bem como a todo o pessoal que nele trabalha, particularmente à Tânia Rosado por todo a ajuda e apoio.

Agradeço a colaboração da Sónia Costa na aquisição de fotografias e da Catarina Pereira Miguel pela ajuda nas análises e interpretação de resultados μ -FTIR.

Agradeço à Milene Trindade pela colaboração neste trabalho e pela disponibilidade que demonstrou. O seu *know-how* foi essencial para que eu concretizasse determinadas etapas deste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório HERCULES, obrigada por proporcionarem as condições ideais para o desenvolvimento deste trabalho, possibilitando-me uma oportunidade ímpar de crescimento académico e pessoal.

Ao Arquivo Fotográfico Municipal de Évora devo um sincero obrigada pela acessibilidade e simpatia com que nos receberam e pela disponibilização de negativos de gelatina para este estudo.

Obrigada à Silverbox Studio pela disponibilização de espécies fotográficas contemporâneas que se revelaram essenciais para o trabalho desenvolvido.

Obrigada à Cátia Relvas, pela força e disponibilidade com que sempre me ajudou.

O meu reconhecimento sincero aos meus amigos, ouvintes atentos das minhas inquietações e esmorecimentos mas também dos sucessos e concretizações.

À minha família agradeço sinceramente o incentivo perante os desafios e a compreensão perante as minhas faltas. Obrigada pelo amor sem reservas.

Agradecimentos.....	i
Índice geral.....	iii
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	xiii
Índice de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
Caracterização do problema.....	xxi
Objetivos do trabalho.....	xxiii
 1. Introdução.....	 1
1.1. História da fotografia.....	3
1.2. Constituição de espécies fotográficas em suporte de vidro.....	6
1.2.1. Ambrótipos.....	7
1.2.2. Negativos de gelatina.....	10
1.3. Degradação de espécies fotográficas em suporte de vidro.....	11
1.3.1. Degradação química.....	12
1.3.2. Biodeterioração/Biodegradação.....	14
1.4. Técnicas analíticas usadas na caracterização material.....	16
1.4.1. Fotografia técnica.....	16
1.4.2. Microscopia ótica.....	17
1.4.3. Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS).....	18
1.4.4. Micro-espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (μ -FT-IR).....	18
1.4.5. Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman).....	19
1.4.6. Espectroscopia de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/Vis).....	20
1.4.7. Micro-difração de Raios-X (μ -DRX).....	20
 2. Metodologia.....	 23
2.1. Estratégia adotada.....	25
2.2. Diagrama de trabalho.....	26
2.2.1. Caracterização material.....	27

2.2.2.	Caracterização microbiológica e avaliação de atividade celulolítica.....	27
2.2.2.1.	Indução de biodeterioração/biodegradação e avaliação do potencial biodeteriogénico dos isolados fúngicos e bacterianos em espécies contemporâneos.....	28
i.	Ambrótipos – avaliação da atividade celulolítica.....	28
ii.	Ambrótipos – avaliação da viabilidade celular	28
iii.	Negativos de gelatina - avaliação da alteração provocada pela presença microbiana.....	29
2.3.	Procedimento experimental.....	30
2.3.1.	Amostras	30
2.3.1.1.	Espécies fotográficas históricas.....	30
2.3.1.2.	Espécies fotográficas contemporâneas.....	30
2.3.2.	Técnicas de caracterização.....	31
2.3.2.1.	Fotografia técnica.....	31
2.3.2.2.	Microscopia ótica	31
2.3.2.3.	Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)	31
2.3.2.4.	Micro-espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (μ -FT-IR).....	32
2.3.2.5.	Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman)	32
2.3.2.6.	Espectroscopia de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)	33
2.3.2.7.	Micro-difração de raios-X (μ -DRX)....	33
2.3.3.	Estudo microbiológico das espécies fotográficas	33
2.3.3.1.	Caracterização microbiológica... ..	33
2.3.3.2.	Isolamento microbiano... ..	34
2.3.3.3.	Identificação de isolados microbianos... ..	35
2.3.3.4.	Avaliação de atividade celulolítica.....	35
2.3.3.5.	<i>Screening</i> da atividade proteolítica... ..	36
2.3.3.6.	Indução de contaminação microbiológica em ambrótipos... ..	36
i.	Avaliação da atividade celulolítica relativa ao ensaio em meio líquido	37
ii.	Avaliação da viabilidade celular relativa ao ensaio em meio sólido	37
2.3.3.7.	Indução de contaminação microbiológica em negativos de gelatina... ..	38

3. Resultados.....	39
3.1. Caracterização morfológica e química de ambrótipos	41
3.1.1. Fotografia técnica.....	41
3.1.2. Microscopia ótica.....	44
3.1.3. Microscopia eletrónica de varrimento acoplada a detetor de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS)	48
3.1.4. Micro-espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (μ -FT-IR)	60
3.1.5. Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman)	66
3.1.6. Micro-difração de raios-X (μ -DRX)	69
3.2. Caracterização microbiológica de ambrótipos	70
3.2.1. Isolamento e identificação de espécies microbianas	70
3.2.2. Avaliação do potencial biodeteriogénico de isolados fúngicos	74
3.3. Caracterização morfológica e química de negativos de gelatina.....	79
3.3.1. Fotografia técnica.....	79
3.3.2. Microscopia ótica.....	81
3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)	84
3.3.4. Micro-espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (μ -FT-IR).....	91
3.4. Caracterização microbiológica de negativos de gelatina.....	95
3.4.1. Isolamento e identificação de espécies microbianas	95
3.4.2. Avaliação do potencial biodeteriogénico de isolados bacterianos	99
 4. Comentários finais e perspetivas futuras	 105
 5. Referências bibliográficas	 111
 6. Anexos.....	 121

1. Introdução

Fig. 1.1. Fotografias sequenciais das sucessivas fases da locomoção do cavalo por Eadweard Muybridge em papel impresso a partir de negativos de colódio húmido.....	5
Fig. 1.2. Representação esquemática de um negativo fotográfico em suporte de vidro: a) sais fotossensíveis; b) solução ou emulsão fotográfica; c) suporte, d) material escuro/opaco.....	7
Fig. 1.3. Ambrótipo onde se pode ver o efeito negativo (imagem negativa conseguida através da inversão de cores de uma imagem normal) e positivo (imagem invertida, quer em cores, quer em posição em relação ao negativo e que se torna visível caso seja colocado um fundo escuro ou opaco no verso do negativo) (Adaptado de Jonathan Baker, 2012)	8
Fig. 1.4. Estrutura e constituição de fotografias em estojo	8
Fig. 1.5. Etapas do processo de produção de negativos de colódio húmido	9
Fig. 1.6. Estrutura básica de negativos de gelatina e prata em suporte de vidro.....	10
Fig. 1.7. Estrutura química do nitrato de celulose.....	12
Fig. 1.8. Representação parcial do ciclo biológico do azoto. a) desnitrificação; b) dissimilação (produção de amónio); c) nitrificação	15
Fig.1.9. Processo de transição de um eletrão a um estado excitado.....	20
Fig. 1.10. Esquema da difração de raios-X (lei de Bragg)	21

2. Metodologia

Fig. 2.1. Esquema de inoculação dos isolados bacterianos obtidos a partir dos negativos de gelatina históricos.....	36
--	----

3. Resultados

Fig. 3.1. Imagem de MEV de uma área de altas luzes da amostra A1 e respetiva análise EDS.	49
Fig. 3.2. Áreas selecionadas para análises por MEV-EDS da amostra A1	51
Fig. 3.3. Mapa de distribuição elementar EDS do ponto 1	51
Fig. 3.4. Análise pontual elementar por EDS do ponto 1: a) verifica-se a presença de Ag e I na superfície da espécie; b) verifica-se a presença de Cu	52
Fig. 3.5. Imagem de MEV e respetivas análises composicionais por EDS do ponto 2: a) área sem solução fotográfica; b) área de solução fotográfica.	53

Fig. 3.6. Imagens MEV que apresentam a presença de microrganismos na superfície da amostra A1 com evidência de hifas e estruturas reprodutoras (esporos)	54
Fig. 3.7. Imagens MEV que mostram a presença de microrganismos no verso da amostra A1 com evidência de hifas e estruturas reprodutoras (esporos)	54
Fig. 3.8. Imagem MEV e respectivas análises pontuais elementares por EDS (do ponto 3) de uma área colonizada por fungos filamentosos no verso da amostra A1. a) presença de colonização microbiana; b) área sem colonização microbiana.	55
Fig. 3.9. Áreas selecionadas para análise por MEV-EDS na amostra A2.....	55
Fig. 3.10. Mapa de distribuição elementar EDS do ponto 1.	56
Fig. 3.11. Imagem de MEV e respectiva análise composicional EDS de uma área do ponto 1 ...	56
Fig. 3.12. Imagens de MEV relativas ao ponto 2; a) presença de micro-cristais, b) ampliação de a, c) partículas de cloro	57
Fig. 3.13. Mapa de distribuição elementar EDS do ponto 2	57
Fig. 3.14. Imagens de MEV relativas ao ponto 2 e respectivas análises pontuais elementares por EDS: 1) análise pontual EDS a um cristal evidenciando a presença de Ag; 2) análise pontual EDS a uma área de solução fotográfica.	58
Fig. 3.15. Imagens de MEV das partículas de ouro e respectiva análise pontual elementar por EDS	58
Fig. 3.16. Imagens de MEV sugestivas da presença de microrganismos: a) colonização superficial na camada de colódio; b) círculo concêntrico sob a camada de colódio e ramificações que penetraram para uma camada inferior; c) presença de estruturas reprodutoras (esporos)....	59
Fig. 3.17. Imagem de MEV de aparente contaminação microbiológica e respectiva análise composicional (EDS).	59
Fig. 3.18. Imagem de MEV da superfície não colonizada do verso da amostra A2	60
Fig. 3.19. Imagens de MEV onde se verifica a presença de colonização microbiológica no verso da amostra A2.....	60
Fig. 3.20. Espectro de μ -FT-IR de uma área que visivelmente não apresenta degradação superficial da amostra A1 e que evidencia a presença de nitrato de celulose	61
Fig. 3.21. Espectro de μ -FT-IR de uma área de baixas luzes (azul) e de uma área de altas luzes (vermelho), pontos <i>a</i> e <i>b</i> , respetivamente	62
Fig. 3.22. Espectro de μ -FT-IR do ponto assinalado, numa área que apresenta um composto orgânico.....	63

Fig. 3.23. Espetros de μ -FT-IR da amostra A1 de uma área visivelmente não colonizada (azul) e de uma área colonizada por microrganismos (vermelho)	64
Fig. 3.24. Espectro de μ -FT-IR da amostra A2 de uma análise num ponto no canto superior esquerdo.	65
Fig. 3.25 Espetros de μ -FT-IR da amostra A2: a) área degradada (vermelho); b) área visivelmente não degradada (azul).....	65
Fig. 3.26. Espetros de μ -FTIR da amostra A2: área visivelmente não colonizada (azul); área colonizada por microrganismos (vermelho).....	66
Fig. 3.27. Espectro de μ -Raman da amostra A1 sugerindo a presença de AgCl	67
Fig. 3.28. Espectro de μ -Raman da amostra A1 sugerindo a presença de Ag ₂ S.....	67
Fig. 3.29. Espectro de μ -Raman da amostra A2 sugerindo a presença de bandas características da fotodecomposição de Ag ₂ S	68
Fig. 3.30. Espectro de μ -Raman da amostra A2 obtido a partir da análise a micro-cristais confirmando a presença de prata.....	68
Fig. 3.31. Difrátogramas da amostra A1 de uma área visivelmente não degradada (azul) e degradada (vermelho) onde se verifica a presença de prata (Ag) e iodeto de prata (AgI), respetivamente.....	69
Fig. 3.32. Atividade celulolítica específica de culturas em meio Basal dos fungos oriundos de A1 com dez dias de incubação. a) <i>Penicillium</i> sp.1; b) <i>Penicillium</i> sp.2; c) <i>Penicillium</i> sp.3; d) Micélio; e) <i>Penicillium</i> sp.4; f) <i>Ulocladium</i> spp.1; g) <i>Penicillium</i> sp.5; h) <i>Trichoderma harzianum</i> CCM1 783. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05)	75
Fig. 3.33. Esquema ilustrativo dos ensaios de simulação. MB - Meio Basal; IF – Isolado Fúngico; CMC - Carboximetilcelulose; Am – amostra.....	76
Fig. 3.34. Atividade celulolítica específica ao fim de 7 dias, relativa aos ensaios em meio líquido	77
Fig. 3.35. Imagens de microscopia ótica que evidenciam a presença de esporos e estruturas reprodutoras no ensaio F	78
Fig. 3.36. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando a presença de contaminação microbiológica no verso dos negativos N1 (esquerda) e N2 (direita). Ampliação: 63x.....	82
Fig. 3.37. Imagens de MEV de uma área de altas luzes da amostra N1 e respetiva análise pontual elementar por EDS	84

Fig. 3.38. Imagens de MEV que demonstram algumas degradações presentes na superfície do negativo N1: a) fraturas do vidro de suporte e depósitos de sujidades; b, c) fissuras e destacamento da emulsão fotográfica; d) depósitos e aglomeração de partículas.....	85
Fig. 3.39. Imagens de MEV que demonstram algumas degradações presentes na superfície do negativo N2: a) fraturas do vidro de suporte e depósitos de sujidades; b) presença de aglomerados e destacamento da emulsão fotográfica; c, d) manchas superficiais (espelho de prata)	85
Fig. 3.40. Áreas selecionadas para análises por MEV-EDS da amostra N1	86
Fig. 3.41. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS do ponto 1: a) área sem emulsão fotográfica; b) área com emulsão fotográfica..	86
Fig. 3.42. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 2 onde se verifica a presença de prata e cloro (a) e prata e enxofre (b).	87
Fig. 3.43. Imagens de MEV que evidenciam a presença de contaminação microbiológica na superfície do negativo N1. a) área de interface entre emulsão fotográfica e vidro de suporte evidenciando a presença de microrganismos; b) emulsão fotográfica colonizada por microrganismos.	88
Fig. 3.44. Áreas selecionadas para análises por MEV-EDS da amostra N2.	88
Fig. 3.45. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 1 verificando-se a presença de prata (a) e prata e enxofre (b).....	89
Fig. 3.46. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 2 que apresenta a ausência (a) e presença de cloro (b).	89
Fig. 3.47. Imagens de MEV que evidenciam a presença de microrganismos na superfície da amostra N2.	90
Fig. 3.48. Mapas de distribuição elemental EDS de uma área aparentemente colonizada do negativo N2.	91
Fig. 3.49. Espectro de μ -FT-IR de uma área degradada (a) e outra área visivelmente não degradada (b) do negativo N1.	91
Fig. 3.50. Espectro de μ -FT-IR de uma área no verso de N1.	92
Fig. 3.51. Espectros de μ -FT-IR de uma área de emulsão fotográfica (a) e sem emulsão fotográfica (b) da amostra N2	93
Fig. 3.52. Espectro de μ -FTIR de uma área visivelmente não degradada da amostra N2.	94

Fig. 3.53. Áreas seleccionadas para indução de contaminação e respectivos isolados bacterianos inoculados: 1) N2_4_4_1; 2) N1_1_5; 3) N2_3_3; 4) N2_3_4	99
Fig. 3.54. Imagens de MEV da superfície do negativo de gelatina contemporâneo que evidenciam a matriz fotográfica sem alterações.....	100
Fig. 3.55. Análises pontuais elementares por EDS da superfície do negativo de gelatina contemporâneo no t7 do ensaio de simulação. a) partícula circular; b) aglomerados de partículas; c) área sem alteração.	102

2. Metodologia

Tabela 2.1. Imagens fotográficas das amostras em estudo.....	1
---	---

Tabela 2.2. Áreas selecionadas para amostragem microbiológica	2
--	---

3. Resultados

Tabela 3.1. Imagens fotográficas dos ambrótipos A1 e A2 sob diferentes iluminações.....	1
--	---

Tabela 3.2. Imagens fotográficas das peças constituintes dos ambrótipos A1 e A2 sob luz natural refletida	1
--	---

Tabela 3.3. Imagens obtidas com lupa binocular evidenciando diferentes deteriorações superficiais presentes em A1 e A2	2
---	---

Tabela 3.4. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro evidenciando áreas deterioradas de A1 e A2.....	2
---	---

Tabela 3.5. Imagens obtidas com lupa binocular evidenciando a presença de contaminação microbiológica nos ambrótipos A1 e A2.....	2
--	---

Tabela 3.6. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro evidenciando a presença de fungos na frente do ambrótipo A1.....	1
--	---

Tabela 3.7. Imagens de MEV representativas das diferentes densidades de partículas formadoras de imagem nas áreas de altas e baixas luzes e interface de ambas as amostras A1 e A2.....	1
--	---

Tabela 3.8. Imagens de MEV de degradações superficiais das amostras A1 e A2	1
--	---

Tabela 3.9. Atribuição das vibrações presentes no nitrato de celulose às bandas observadas no espectro de infravermelho obtido na área em análise	1
--	---

Tabela 3.10. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A1	1
--	---

Tabela 3.11. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra A1.	1
---	---

Tabela 3.12. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A2.	1
--	---

Tabela 3.13. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra A2	1
---	---

Tabela 3.14. Imagens fotográficas dos negativos N1 e N2 sob diferentes iluminações.....	1
--	---

Tabela 3.15. Imagens fotográficas dos negativos N1 e N2 fotografias com luz normal refletida sobre fundo negro.....	1
Tabela 3.16. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico apresentando diferentes deteriorações bem como a presença de retoque fotográfico nas amostras N1 e N2.....	1
Tabela 3.17. Imagens obtidas com microscópio de campo escuro de áreas degradadas das espécies de gelatina N1 e N2.....	1
Tabela 3.18. Imagens de MEV representativas das diferentes densidades das partículas formadoras de imagem nas áreas de altas luzes, de baixas luzes e interface entre ambas, das amostras N1 e N2.	1
Tabela 3.19. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra N1 e respetiva identificação.....	1
Tabela 3.20. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra N1 e respetiva identificação	1
Tabela 3.21. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra N2 e respetiva identificação.....	1
Tabela 3.22. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra N2 e respetiva identificação	1
Tabela 3.23. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo obtidas com microscópio estereoscópico no t0 do ensaio de simulação..	1
Tabela 3.24. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo adquiridas com microscópio estereoscópico e MEV no t7 do ensaio de simulação.....	1
Tabela 3.25. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo adquiridas com microscópio estereoscópico e MEV no t15 do ensaio de simulação.....	1

A	absorvância
A1	Ambrótipo 1
A2	Ambrótipo 2
Am	Amostra (ambrótipo contemporâneo)
AN	abertura numérica
BSA	albumina sérica bovina
CBH	celobiohidrolases
CBR	rosa de Bengala cloranfenicol
DNS	ácido dinitrossalicílico
DRX	difração de raios-X
ICDD	Centro Internacional de dados de Difração de raios-X
EC	<i>enzyme Comission</i>
EnG	endoglucanases
ES	eletrões secundários
ER	eletrões retrodifundidos
ExG	exoglucanases
FPA	<i>filter paper activity</i>
μ-FT-IR	micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo IV - espectroscopia de infravermelho
IF	Isolado fúngico
MB	Meio basal
MEA	malte extrato agar
MEV-EDS	microscopia eletrônica de varrimento com espectroscopia de raios-x por dispersão em energias acoplada
MRD	meio de ressuspensão
MT T	sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N1	negativo de gelatina e prata 1
N2	negativo de gelatina e prata 2
NA	nutriente Agar
NC	nitrato de celulose
μ-Raman	micro-espectroscopia de Raman
RBM3	rollei black magic 3
T	transmitância
TSA	agar triptona de soja
UV	ultravioleta
UV/VIS	ultravioleta/visível
βG	β-glucosidades

YEPD extrato de levedura

Neste trabalho foram estudadas quatro espécies fotográficas, dois ambrótipos do séc. XIX e dois negativos de gelatina do séc. XX. Estas espécies são suscetíveis a degradações, físicas, químicas e microbiológicas. Técnicas de análise não destrutivas como, a fotografia, a microscopia ótica, a microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energias, a micro-espectroscopia de infravermelho em modo de reflexão total atenuada, a micro-espectroscopia de Raman e a micro-difração de raios-X foram utilizadas na caracterização material. A colonização microbiológica das amostras foi estudada através do isolamento e caracterização dos microrganismos contaminantes. Foram ainda realizados estudos de determinação de atividade celulolítica para os isolados fúngicos provenientes dos ambrótipos bem como ensaios de simulação, nos quais se utilizaram estes isolados para induzir contaminação em ambrótipos contemporâneos e assim avaliar o seu potencial biodeteriogénico. Foi ainda avaliado o potencial biodeteriogénico de isolados bacterianos em negativos de gelatina contemporâneos.

Material and microbiological characterization of photographic specimens

This work presents a scientific study of four photographic specimens, two ambrotypes and two gelatin-silver negative plates from 19th and 20th century, respectively. These specimens are susceptible to physical, chemical and microbiological degradations. A non-destructive approach was used based on techniques such as technical photography, optical microscopy, scanning electron microscopy, infrared micro-spectroscopy, micro-Raman spectroscopy and X-rays micro-diffraction. Microbiological colonization of the samples was studied by isolation and characterization of the contaminating microorganisms. Studies to evaluate cellulolytic activity of fungal isolates from the ambrotypes were carried out and also simulation assays in which were used these isolated to induce contamination in contemporary ambrotypes were done to evaluate their biodeteriogenic potential. It was also studied the biodeteriogenic potential of the bacterial isolates from gelatin-silver negative plates which were subsequently inoculated in contemporary gelatin-silver negatives.

As espécies fotográficas em estudo, ambrótipos e negativos de gelatina são extremamente sensíveis e estão suscetíveis a diversos tipos de degradação, física, química e microbiológica. As degradações são geralmente causadas por condições de armazenamento e ambientais inapropriadas, manipulação desadequada, pelo próprio processamento químico, e por vezes pelas tentativas de intervenções e limpeza. Uma degradação química bastante comum e que afeta estas espécies de forma muito marcada é o espelho de prata; exemplo comum entre estes géneros de espécies fotográficas e que é o resultado da presença de manchas superficiais de cor de chumbo com um brilho metálico que podem comprometer irremediavelmente a imagem fotográfica.

A biodeterioração/biodegradação é um problema emergente que afeta estas espécies e que carece de estudos para que se percebam quais os mecanismos utilizados pelos microrganismos contaminantes a fim de se solucionar o problema.

A fotografia é um documento importante na reconstrução da história e na preservação da memória; as espécies fotográficas fazem parte de um património gráfico da Humanidade e representam um enorme contributo para o avanço da ciência e tecnologia.

Apenas será possível valorizar e conservar as espécies fotográficas se se conhecer e estudar o seu todo. O estudo dos materiais e processos de fabrico e dos padrões de degradação e dos seus produtos é fundamental e para tal é necessário recorrer a técnicas de análise não-destrutivas que permitam recolher um leque variado de informações relevantes salvaguardando sempre a integridade da espécie fotográfica. Há também que considerar os métodos utilizados para o acondicionamento dos mesmos e os materiais e condições que estes envolvem. Estes conhecimentos são fundamentais para tentar melhorar os métodos e condições de conservação de materiais fotográficos permitindo desta forma indicar instruções práticas e úteis de maneira a que se mantenha este património salvaguardado.

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho centrou-se na caracterização morfológica e química de quatro espécies fotográficas. Propôs-se a compreensão dos materiais e métodos de produção destas espécies fotográficas e a avaliação das degradações presentes nos mesmos através da utilização de diferentes técnicas analíticas, bem como, a determinação e avaliação da colonização microbiológica contaminante bem como na realização de estudos de simulação a partir indução de contaminação microbiológica em espécies fotográficas contemporâneas a fim de avaliar o potencial biodeterioração de microrganismos.

Objetivos específicos

Conhecer

- composição de espécies fotográficas distintos
- degradações físicas, químicas e microbiológicas presentes em espécies fotográficas alternativos
- técnicas analíticas não destrutivas utilizadas na caracterização material

Compreender

- alterações morfológicas e cromáticas que comprometem a leitura da fotografia
- a influência da colonização microbiológica na degradação das espécies

Valorizar

- promover a salvaguarda e valorização do património fotográfico

Aplicar

- isolamento e identificação de microrganismos contaminantes das espécies fotográficas
- avaliar a atividade celulolítica dos isolados fúngicos
- induzir contaminação microbiológica em espécies fotográficas contemporâneas
- avaliar a influência dos isolados fúngicos e bacterianos na degradação dos ambrótipos e negativos de gelatina, respetivamente

INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRIA DA FOTOGRAFIA

A história da fotografia difunde-se, inevitavelmente, na história da linguagem visual. A imagem não é uma inovação dos dias de hoje, antes pelo contrário, desde a era Neolítica que se sentia necessidade de registar e prolongar a memória e para isso foram utilizados diversos recursos dos quais o melhor exemplo são as representações da vida quotidiana, de pessoas ou animais em pinturas rupestres durante a pré-história (Harrell, 2003). Contudo, a linguagem visual foi evoluindo ao longo dos tempos, bem como os processos que a transmitiam. A invenção da fotografia em meados do século XIX é um dos primordiais exemplos que veio revolucionar a forma como olhamos o mundo, transformando o ordinário em extraordinário. O aparecimento da fotografia derivou de várias causas, das quais se destacam a necessidade de registo visual, expressividade e documentação, informação e divulgação de factos, bem como, a necessidade das indústrias em utilizar imagem impressa. Em suma, deveu-se à adaptação para usos comerciais e foi acompanhada pelo desejo artístico e estético associado à função social que a pintura desempenhava neste século (Kossov, 2014).

Desde o seu aparecimento, a fotografia foi recebida com imenso entusiasmo e tem vindo a ser admirada como uma obra de arte e valorizada pela sua contribuição para o avanço da ciência e tecnologia e da compreensão da história. Com o avançar dos tempos esta conquistou curiosos e reticenciosos. Em suma, a fotografia veio essencialmente responder tanto às necessidades estéticas como económica-industriais da sociedade. Roland Barthes (1980) classifica a fotografia como uma imagem híbrida, pois é construída, por um lado, por um aparelho técnico e por outro, por uma mensagem com conteúdo histórico, social e cultural. Susan Sontag (1986) sublinhou a importante relação entre o registo/memória e a fotografia, citando que o ato de tirar fotografias permite conservar um passado que desaparece. Assim, o percurso da fotografia até aos dias de hoje e a importância desta permite considerá-la parte indissociável da experiência humana. A fotografia impressiona não apenas pela imagem que oferece mas essencialmente pela história que conta. Todo o encanto e misteriosidade da fotografia são o facto de esta transformar acontecimentos em objetos, eternizando-os.

Uma das principais e mais relevantes descobertas que levaram posteriormente à invenção da fotografia foi a câmara escura. O conhecimento dos seus princípios óticos já era relatado por Aristóteles, cerca de 300 anos antes de Cristo (Leggat, 2001). Um dos registos mais antigos que descreviam a utilização desta câmara pertence a Leonardo Da Vinci e foi encontrado no caderno de notas do mesmo no período entre 1452 e 1519. Em 1604 foi utilizada pela primeira vez, pelo astrónomo Johannes Kepler. Este objeto consistia, tal como o nome indica, numa câmara/compartimento escuro (completamente fechado para que a presença de luz fosse nula), com exceção de um pequeno orifício numa das paredes para que uma imagem do exterior pudesse ser projetada numa parede branca colocada em frente a esse orifício, surgindo a imagem invertida (Leggat, 2001). Apesar de no século XVIII, Johann Shulze (químico sueco) ter descoberto que compostos de prata escureciam devido ao poder redutor da luz, foi no século XIX que o processo físico-químico da fotografia foi sistematizado e alcançou viabilidade técnica efetiva e desta forma a fotografia marcou a sua posição no mundo da imagem. Segundo Werge (1890), Shulze produziu uma imagem fotográfica através de um pedaço de papel coberto com uma mistura de nitrato de prata e cloreto de sódio, sem recurso a câmara, apenas pela exposição solar, sendo por isso considerado, o pai da fotografia. Joseph Nicéphore Niépce foi um dos responsáveis pelas primeiras experiências

bem-sucedidas. Este inventor utilizou a câmara escura numa tentativa de descobrir um processo litográfico. Foi através da utilização de papel sensibilizado com cloreto de prata que Nièpce conseguiu produzir uma imagem, mas esta não era permanente. Apenas em 1826, utilizando uma substância à base de verniz de asfalto, denominada por betume da judeia (substância fotossensível) aplicada sobre vidro, endurecida e posteriormente associada a uma mistura de óleos, Nièpce conseguiu fixar a imagem. A exposição de uma placa de estanho coberta de betume da judeia na câmara escura durante oito horas resultou então na obtenção de uma imagem (Carvalho, 2006). Assim, a primeira fotografia de que há registo data de 1826, sendo Nièpce o seu autor, que a autodenominou por heliografia (escrita com a luz). Em 1829 Nièpce associou-se ao francês Louis Jacques Mandé Daguerre (pintor e cenarista) e numa parceria prosseguiram a investigação com o objetivo de melhorar o processo fotográfico, particularmente, de reduzir o tempo de exposição (Carvalho, 2006). Foi no ano de 1835 que Daguerre descobriu como revelar imagens. Ao realizar o processo normal, expôs algumas chapas de metal, colocando-as de seguida num armário que continha vários frascos de produtos químicos. Após alguns dias, quando observou as chapas, apercebeu-se de que havia obtido uma imagem latente. Daguerre percebeu assim que o vapor de mercúrio revelava as imagens, facto que permitiu reduzir o tempo de exposição de oito horas para cerca de vinte a trinta minutos (Clode, 2010). O processo inventado por Daguerre foi denominado de daguerreotipia com o qual se obtiveram os chamados daguerreótipos, ou seja, imagens invertidas com uma nitidez impressionante sobre uma placa de metal. Neste mesmo ano, Henry Fox Talbot, escritor e cientista inglês, já tinha conseguido fixar quimicamente imagens projetadas pela câmara escura sobre uma folha de papel e quando teve conhecimento do anúncio da descoberta de Daguerre, Talbot tentou reclamar a invenção da fotografia, mas sem sucesso. Porém, em 1840 impregnou uma folha de papel com sais de prata, tornando-a sensível à luz. Quando exposta ao sol, o cloreto de prata escurecia e ao fim de alguns minutos formava-se uma imagem de fundo avermelhado. Calótipo, foi o nome que atribuiu à técnica fotográfica que inventou, a qual patenteou no ano de 1841 (Leyshon, 1984; Pavão, 2011).

O vidro, que já tinha sido utilizado como “capa protetora” dos daguerreótipos, começou a ter um papel fundamental na fotografia. O primeiro processo fotográfico que surgiu sobre suporte de vidro foi o negativo de albumina, na década de 1840, usando a clara do ovo, material transparente, como o material ligante que juntamente com os halogenetos de prata, formava a solução fotográfica (Valverde, 2005). A invenção do colódio foi um marco importante na evolução da fotografia que surgiu no ano de 1848. Frederick Scott Archer, escultor inglês, em colaboração com Peter W. Fry, foram os autores desta descoberta. Archer descobriu que o colódio (substância de origem vegetal, à base de nitrato de celulose dissolvido em éter e álcool) se tornava um material sensível à luz quando misturado com outros reagentes e em contato com o nitrato de prata. Segundo Valverde (2005), o processo requeria que uma placa de vidro transparente fosse coberta por colódio ao qual se adicionavam soluções de iodeto ou brometo de diferentes metais alcalinos e, posteriormente, a placa era imersa numa solução de nitrato de prata e exposta à luz quando ainda estava húmida (razão pela qual a técnica se denomina colódio húmido); caso contrário tornava-se impermeável às soluções de revelação. Era utilizado ácido gálico para revelar a imagem e a fixação era feita com cianeto de potássio ou tiosulfato de sódio.

Uma das aplicações deste processo denominou-se ambrótipo: negativo de colódio húmido, intencionalmente subexposto, que figurava como positivo quando colocado sobre um suporte ou revestimento negro (Duncan, 2009). O vidro emulsionado era colocado na câmara e as zonas expostas à luz tornavam-se opacas, ao contrário do que acontecia nas zonas de sombra, que permaneciam transparentes. A necessidade de sensibilização e revelação momentânea representavam

algumas das desvantagens do processo. Na sua generalidade, os ambrótipos careciam do brilho característico dos daguerreótipos, mas eram mais fáceis de produzir e o facto de poderem ser entregues no próprio dia da sua produção era um fator de atração para fotógrafos e clientes. Os ambrótipos tiveram sucesso durante muitos anos, até que foram sendo substituídos por um processo mais rápido e barato, o ferrótipo (patenteado em 1856 por Hamilton Smith). A sua técnica de produção não sofreu alterações relativamente ao ambrótipo, sendo que a principal diferença entre ambos é a substituição do suporte de vidro por uma chapa de ferro (Carreti *et al.*, 2009).

O processo fotográfico de colódio húmido permitiu a produção de provas em papel de albumina que eram impressas a partir dos negativos de vidro e dos quais se podiam fazer várias cópias. Um dos trabalhos fotográficos em colódio húmido mais famoso foi “The Horse in Motion” de Eadweard Muybridge em 1878, no qual este fotógrafo conseguiu reproduzir pela primeira vez uma sequência de imagens que permitia descodificar os diferentes tipos de movimento do cavalo e para o qual teve que utilizar cerca de 12 a 24 câmaras dispostas lado a lado em frente a uma tela refletiva. Na figura 1.1. está representado um exemplar da sequência obtida.



Figura 1.1. Fotografias sequenciais das sucessivas fases da locomoção do cavalo por Eadweard Muybridge em papel impresso a partir de negativos de colódio húmido (Herbert, 2002).

Segundo Ricci e colaboradores (2007), a utilização de fotografias em papel de albumina foi oficialmente reclamado em 1850 por Louis Blanquart-Evard's. O papel de albumina era feito revestindo uma folha de papel com clara de ovo misturado com amónia e/ou cloreto de prata. Este processo tornou-se então o suporte de impressão fotográfica mais utilizado a partir de 1855 até 1890.

Em 1864 William Bolton e Benjamin Sayce publicaram um processo de produção que se baseava na utilização de colódio e brometo de prata que eram colocados diretamente numa placa de vidro e que eliminava o passo da sensibilização. No entanto, foi Richard Maddox, em 1871 (Pavão, 2001; Valverde, 2005) quem criou um processo de chapas secas através da fixação de iodetos e/ou brometos de prata em gelatina, emulsão diretamente colocada na placa de vidro. Este processo trouxe enormes vantagens, marcando um período de transição na história da fotografia; tornou o processo mais simples e ágil, permitindo a produção industrial de negativos e, consequentemente, permitiu a expansão e difusão da fotografia. A investigação e inovação na área da fotografia prosseguiram a bom ritmo, mas o negativo de vidro foi sem dúvida o material que até esta data permitiu reunir as melhores características de todos os processos anteriores.

No final da década de 1880 as placas de vidro foram substituídas por tiras de papel (nitrato e acetato de celulose), cuja invenção foi atribuída a George Eastman, inventor da primeira máquina Kodak (Newhall, 2002). Em 1887 foi criada a primeira película com suporte de plástico, o nitrato de celulose (éster de celulose que resulta do tratamento da celulose com ácido sulfúrico e nítrico), sobre

a qual se depositava a emulsão de gelatina, tendo sido John Carbutt quem produziu a primeira prova (Valverde, 2005). Este foi o único suporte de plástico até à década de 1920 e que foi utilizado até 1940. Como o nitrato de celulose altamente inflamável, principalmente por razões de segurança, começou a ser substituído no início de 1950 pelo triacetato de celulose que foi utilizado até à segunda metade de 1990, data em que o poliéster (ou tetraftalato de polietileno) assume o seu lugar por ser mais resistente à deformação e apresentar qualidade superior (Bushong, 2008).

Desde a invenção dos primeiros processos fotográficos que se procurava conseguir obter fotografia com cor. As emulsões fotográficas daquela altura eram sensíveis ao azul e à radiação ultravioleta, minimamente sensíveis ao verde, mas insensíveis ao resto do espectro eletromagnético na zona do visível. Segundo Kapecki (2013), em 1873 o químico Herman Vogel descobriu que alguns corantes aumentavam a sensibilidade dos sais de prata à luz verde, amarela e mais tarde, à vermelha, quando adicionados à emulsão fotográfica. As primeiras chapas de gelatina sensíveis ao verde e ao azul designaram-se por chapas ortocromáticas. O trabalho de Vogel foi sendo melhorado ao longo do tempo até que Gabriel Lippmann desenvolveu um método para a reprodução fotográfica das cores baseado no fenómeno de interferência (o único que não requeria corantes), descoberta que lhe concedeu o prémio Nobel da Física no ano de 1908 (Triarhou & Cerro, 2008). A solução definitiva para a fotografia a cores foi encontrada a 1891, mas o primeiro processo fotográfico industrial em cor foi apresentado apenas em 1907 pelos irmãos Louis e Auguste Lumière e denominava-se *autochrome* (Lavédrine & Gandolfo, 2013). O processo baseava-se na utilização de grãos de fécula de batata corados com as diferentes cores (laranja-avermelhado, verde, violeta), misturados e espalhados sobre a superfície das chapas de vidro, onde posteriormente se colocava carvão em pó para preencher os espaços entre grãos e finalmente se sobrepunha uma emulsão pancromática de brometo de prata, sensível a todo o espectro eletromagnético na zona do visível (Kapecki, 2013). O resultado era um positivo transparente, em vidro, com sensibilidade à cor. Posteriormente surgiram as provas em papel cromogéneo – fotografia constituída por três camadas de cor sobrepostas. Segundo Lavédrine & Gandolfo (2013) foram dois irmãos músicos, Leopold Mannes e Leopold Godowsky, que inventaram este processo, o *Kodachrome*, que começou a ser comercializado em 1932 pela Kodak.

1.2. CONSTITUIÇÃO DE ESPÉCIES FOTOGRÁFICAS EM SUPORTE DE VIDRO

Um negativo fotográfico é portador da imagem captada por uma câmara. A produção de negativos variou ao longo do tempo, tanto em processos como em suportes e após a sua produção em papel passaram a ser feitos em vidro. As suas características físicas, como a resistência e a transparência popularizaram-no no mundo da fotografia. No entanto, como afirmava Kodak (1985), apesar de o vidro ser um material inerte, é frágil e quebradiço, características que se acentuam com o passar do tempo. A manutenção e acondicionamento indevido levavam muitas vezes à sua quebra com consequente perda da imagem.

Os negativos em suporte de vidro diferenciam-se consoante o ligante utilizado com os sais de prata que apresentam, solução fotográfica de colódio ou emulsão de gelatina e a sua constituição é repartida por camadas distintas.

Na figura 1.2 é apresentado um esquema básico da constituição de um negativo fotográfico.

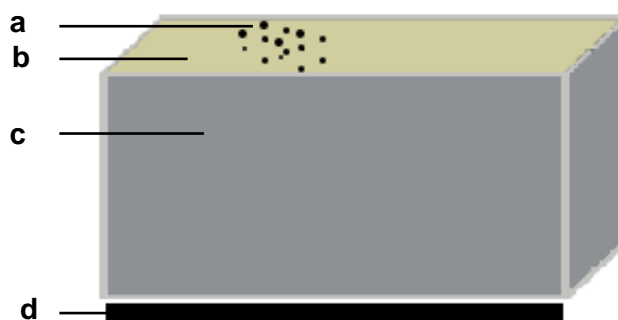


Figura 1.2. Representação esquemática de um negativo fotográfico em suporte de vidro: a) sais fotossensíveis; b) solução ou emulsão fotográfica; c) suporte, d) material escuro/opaco.

A primeira camada (Fig. 1.2a) representa os sais fotossensíveis (halogenetos de prata). A disposição dos sais varia consoante o ligante utilizado nos diferentes processos. No caso dos negativos de colódio húmido, os sais encontram-se depositados na superfície da camada de colódio mas também se encontram suspensos imediatamente abaixo dessa camada. Em relação aos negativos de gelatina, os sais são dispersos pelo ligante dando origem a uma emulsão. A imagem é então formada por uma solução ou emulsão fotográfica que é constituída pelo ligante, colódio ou gelatina e pelos sais de prata (partículas fotossensíveis) (1.2b). O suporte (Fig. 1.c) é o vidro cuja composição básica era geralmente dióxido de silício (SiO_2), carbonato de sódio (Na_2CO_3) ou cloreto de potássio (KCl) e óxido de cálcio (CaO). Este tipo de vidro é denominado por soda-cálcico e representa cerca de 90% do vidro fabricado nesta altura (Whitman, 2007). Para a produção de vidro usado em fotografia, este era fundido, vertido e espalhado sobre uma mesa plana até que atingisse a espessura desejada e de seguida era colocado no forno a cozer (Whitman, 2007). Após a cozedura era polido com recurso a areia e água. Quando se pretendia ver uma imagem positiva (como é o caso dos ambrótipos) sob o vidro colocava-se um material opaco (Fig. 1.2d), como tinta negra, papel, tecido, entre outros (Pavão, 2011).

1.2.1. AMBRÓTIPO

O ambrótipo (Fig. 1.3), nome de origem grega que significa ἀμβροτός “imortal” e τύπος “impressão”, ou seja, impressão imortal, foi oficialmente inventado por Frederic Scott Archer em 1851 e o seu processo foi patenteado por James Ambrose Cutting em 1854 (Leggart, 2001; Burgess, 1858). Esta tipologia de espécie fotográfica representa uma evolução relativamente aos seus antecessores, com algumas alterações no que diz respeito ao suporte e materiais.



Figura 1.3. Ambrótipo onde se pode ver o efeito negativo (imagem negativa conseguida através da inversão de cores de uma imagem normal) e positivo (imagem invertida, quer em cores, quer em posição em relação ao negativo e que se torna visível caso seja colocado um fundo escuro ou opaco no verso do negativo) (Adaptado de Jonathan Baker, 2012).

De forma resumida, um ambrótipo é essencialmente um negativo, tornado positivo pelo uso de uma camada opaca no lado oposto ao da imagem, obtido com uma placa de vidro coberta com uma camada de colódio (solução fotográfica) que contém os sais fotossensíveis que dão origem a uma imagem fotográfica. A imagem era normalmente protegida com um verniz. Na figura 1.4 está representado um esquema da constituição de um ambrótipo num estojo onde se evidenciam as diferentes peças que o compõe.

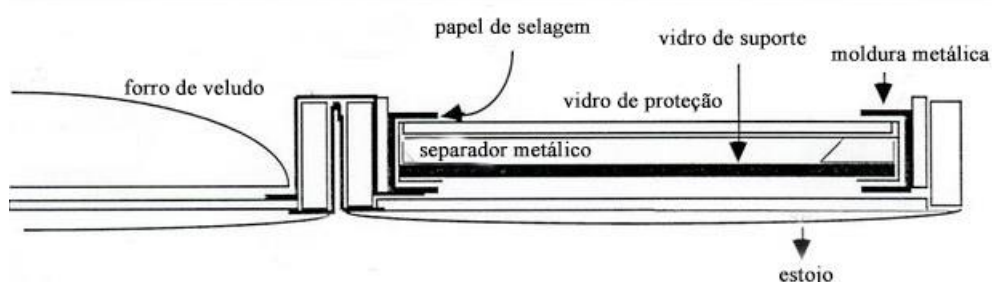


Figura 1.4. Estrutura e constituição de fotografias em estojo. (Adaptado de McElhone, 1998)

Uma vez obtida a imagem fotográfica era colocado sobre a mesma uma moldura de latão que cobria as suas margens, enaltecendo esteticamente o espécime, e à moldura sobrepunha-se uma segunda placa de vidro que tinha a função de proteção e que era muitas vezes fixada com auxílio de colas ou resinas (McElhone, 1998). Este conjunto era finalmente acondicionado numa caixa de madeira forrada a cabedal ou plástico, frequentemente denominada de estojo.

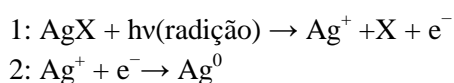
A lista de materiais utilizados na produção de ambrótipos era bastante longa e a complexidade do processo variava significativamente de fotógrafo para fotógrafo. De modo sumário o processo de produção é descrito de seguida. O vidro utilizado para a produção de ambrótipos deveria estar limpo para evitar eventuais defeitos na imagem ou destacamentos. Como o vidro é um material pouco poroso era necessário polir a sua superfície antes de aplicar a solução de colódio. Para o polimento eram utilizadas soluções alcalinas ou pós (como o carbonato de cálcio), aplicados com álcool que se espalhavam usando pedra-pomes ou espátulas próprias (Valverde, 2005; Pavão, 2001). Este procedimento produzia micro-abrasão na superfície do vidro, facilitando a adesão da

solução fotográfica. Após o polimento seguia-se a aplicação da solução fotográfica essencialmente constituída por colódio (nitrato de celulose dissolvido em etanol e éter dietílico na proporção de 1:3) (Fig. 1.5) contendo soluções de iodetos ou brometos de diferentes metais alcalinos, alcalino-terrosos ou de transição (potássio, sódio, amónio, lítio, zinco, ferro, cálcio ou cádmio). As soluções mais comumente utilizadas eram iodetos e brometos de cádmio e potássio. Por vezes, para auxiliar este processo e impedir que a solução escorresse para a parte interna do vidro colocava-se uma solução de albumina misturada com água nas extremidades do vidro. Posteriormente, a placa de vidro ainda húmida era mergulhada numa solução de nitrato de prata (AgNO_3) (Fig. 1.5.) para que se formassem os sais de iodeto de prata e/ou brometo de prata, sendo este procedimento denominado por sensibilização (Carreti, *et al.*, 2009; Valverde, 2005; Maurice, 1993).



Figura 1.5. Etapas do processo de produção de negativos de colódio húmido (Ciliberto *et al.* 2013).

Deverá depois ocorrer a exposição à luz para originar a imagem latente. Carreti e seus colaboradores (2009) descrevem este passo na produção de ferrótipos mas o mesmo está na base do que se passa para os ambrótipos. O autor refere que a interação entre a luz e os halogenetos de prata vai induzir a fotoredução de AgX , originando a formação de *clusters* como Ag_n^+ e Ag_n^0 que contêm átomos livres de prata. O mecanismo reaccional pode ser descrito da seguinte forma:



Este mecanismo dá origem à imagem latente que é invisível até que se proceda à sua revelação. Para este processo era inicialmente utilizado ácido pirogálico com nitrato de prata mas segundo Valverde (2005), o ácido pirogálico foi rapidamente substituído por sulfato de ferro. A revelação tinha como principal objetivo converter a imagem latente numa imagem visível e permanente. Revelada a imagem era preciso fixá-la e, para isso, o primeiro agente utilizado foi o tiosulfato de sódio, mas a sua remoção da camada de colódio era difícil e, sendo insuficientemente removido, acabaria por cristalizar seguindo-se a descoloração e destruição da imagem. Este agente acabou por ser substituído por cianeto de potássio porque deixava a imagem mais brilhante. Towler (1864) refere que além do cianeto de potássio e do tiosulfato de sódio era ainda usado o sulfocianeto de amónia. Esta era uma etapa importante do processo em que o agente fixador removia os sais de prata que não ficavam expostos (Osterman, 2009; Valverde, 2005). Posteriormente procedia-se a uma lavagem para remover tanto o agente de fixação em excesso como os produtos resultantes desse

mesmo processo e, opcionalmente, seguia-se para a intensificação (não era uma etapa crucial e, por isso, nem todos os fotógrafos optavam por o fazer). A intensificação tinha como principal objetivo aumentar a opacidade da imagem e para tal utilizava-se ácido gálico ou nitrato de prata. Para finalizar, depois de seca, a imagem era envernizada para proteção da mesma. Há referência a inúmeros compostos usados com este propósito, mas os mais comuns eram a goma-laca, a goma de sandarac, o óleo de lavanda, o óleo de linhaça e a cânfora (Rogge, 2014; Valverde, 2005; Pavão, 2001). O processo de secagem podia ser feito a quente, utilizando uma lamparina, o que fazia evaporar o álcool e fixar o verniz.

A imagem aparecia como um positivo quando colocada contra uma superfície escura e para tal utilizava-se tecido, veludo, papel ou vernizes pretos. Com o avançar dos tempos começaram a aparecer vidros coloridos os quais se denominavam por *ruby*. Estes vidros apresentavam uma cor castanha-avermelhada que levou ao desuso das superfícies de fundo escuras. Seguindo os passos do daguerreótipo, os ambrótipos também foram retocados. Maurice (1993) refere alguns dos materiais que eram utilizados para colorir as espécies, tais como, pigmentos e óleo ou tinta à base de água. Os pigmentos eram aplicados diretamente sobre a solução fotográfica e o excesso removido com auxílio de um equipamento de sopro.

1.2.2. NEGATIVOS DE GELATINA

Os negativos de gelatina foram inventados em meados de 1871 e a sua produção era bastante mais fácil do que a dos ambrótipos. Richard Leach Maddox foi o grande impulsionador deste processo em que uma emulsão de gelatina sensibilizada (material com substâncias fotossensíveis que a tornam sensível à luz) por sais de prata é colocada sobre um suporte de vidro (Valverde, 2005). Quando estes negativos começaram a ser comercializados, rapidamente convenceram os fotógrafos pela simplicidade e agilidade do processo quando comparado com o dos ambrótipos e, por isso, rapidamente destronaram os seus antecessores. Este processo revolucionou a prática da fotografia, permitindo aos fotógrafos ir para o exterior apenas com a câmara e as placas sensibilizadas. A fotografia deixou então de ser exclusiva de profissionais e assumiu um carácter artístico e criativo nunca antes conseguido.

Os negativos de gelatina (Fig. 1.6) eram considerados negativos de duas camadas, pois eram produzidos apenas com o suporte (matriz) e a emulsão (ligante com a substância fotossensível dispersa).

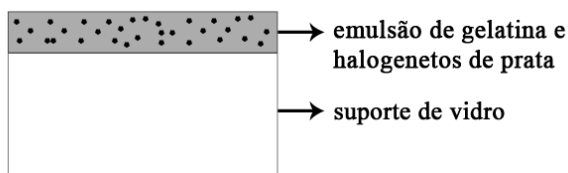


Figura 1.6. Estrutura básica de negativos de gelatina em suporte de vidro.

A primeira fase de produção consistia no polimento do vidro. Tal como nos ambrótipos, para que a emulsão fotográfica aderisse à superfície do vidro, era necessário que este fosse polido de modo a aumentar a porosidade. Após este processo, de forma a impedir destacamentos, o vidro era

tratado com uma solução de silicato de sódio (Gillet *et al.*, 1986). A fase seguinte distingue-se do processo descrito anteriormente pois neste caso, é utilizada uma emulsão fotográfica ao invés de uma solução e esta era constituída pela gelatina (ligante) e por sais de prata. A gelatina é um material muito importante no fabrico dos negativos, uma vez que mantém os microcristais de halogenetos de prata dispersos homogeneamente por toda a superfície do negativo. Este material era normalmente de origem animal e os sais mais utilizados eram brometos de prata apesar de haver também algumas referências a iodetos. Segundo Osterman (2007), Marc Gaudin foi o primeiro a utilizar iodeto de prata, procedimento que não teve sucesso e, por isso em 1871, Richard Maddox substituiu o iodeto de prata por brometo de prata. Muitas vezes eram utilizados ambos, brometo e iodeto de prata e, nesse caso, as emulsões denominavam-se bromo-iodetos de prata.

Lavédrine (2007) e Valverde (2005) descrevem sumariamente o processo de produção dos negativos de gelatina. A emulsão fotográfica era produzida a partir da adição de soluções de brometos e/ou iodetos de metais alcalinos à gelatina e posteriormente o nitrato de prata, formando-se os brometos e/ou iodetos e prata que constituem o material fotossensível. A preparação da emulsão resumia-se a esta etapa ao contrário do que acontecia com os ambrótipos. A reação química é semelhante à que ocorre na produção de ambrótipos, ou seja, os brometos e/ou iodetos reagiam com o nitrato de prata dando origem a brometos e/ou iodetos de prata (substância fotossensível). A emulsão obtida era então colocada sobre o vidro e deixado a secar. No momento em que o fotógrafo precisava de tirar uma fotografia, ocorria a exposição à luz, em que se colocava o suporte emulsionado na câmara fotográfica durante alguns segundos para a formação da imagem latente que passava de invisível a visível e permanente (etapa de revelação) através da utilização de agentes inorgânicos como sais metálicos ou orgânicos como ácido pirogálico e a hidroquinona, entre outros. Segundo Valverde (2005) a imagem nos negativos de gelatina é formada por partículas de prata de maiores dimensões relativamente aos negativos de colódio húmido. Posteriormente a imagem era endurecida, fixada com tiosulfato de sódio e lavada para eliminar o excesso de tiosulfato de prata formado durante a fixação, e depois poderia sofrer uma intensificação, com recurso a iodeto de mercúrio ou brometo de cobre, não sendo considerada uma etapa fundamental no processo (Valverde, 2005; Lavédrine & Garnier, 1989). Para terminar, a espécie era ocasionalmente envernizada para sua proteção.

1.3. DEGRADAÇÃO DE ESPÉCIES FOTOGRÁFICAS EM SUPORTE DE VIDRO

As espécies fotográficas em suporte de vidro apresentam um desafio enorme no que diz respeito à sua conservação e preservação, tanto pela sua estrutura frágil como pela sua constituição química. São bens históricos culturais complexos constituídos por uma enorme variedade de elementos, pelo que são necessários conhecimentos acerca dos métodos e materiais envolvidos na sua produção para entender os processos de degradação que os afetam (Bahnmann, 2012). No que diz respeito às espécies de vidro, são consideradas diferentes tipos de degradação: a degradação física, que resulta de manuseamento incorreto (Clark, 1997), e a degradação química, que pode ser devida aos materiais constituintes, procedimentos mal executados durante o desenvolvimento da imagem (presença de químicos residuais, tempos de produção inadequados, entre outros) e exposição a condições ambientais pouco estáveis e inapropriadas (Parry, 2011). Segundo Lourenço e Sampaio (2007) a biodeterioração pode também ocorrer nestes espécies fotográficas devido à ação de diferentes agentes biológicos, podendo ser considerado uma das causas mais graves da sua alteração. Contudo, são escassos os estudos focados na interação entre os microrganismos e o material

fotográfico, o que indica uma necessidade emergente de explorar esta área onde a escala do problema permanece desconhecida.

1.3.1. DEGRADAÇÃO QUÍMICA

A maioria dos materiais fotográficos do séc. XIX e XX revela uma grande variedade de problemas de conservação, dos quais se destacam as deteriorações químicas, que são de natureza variada e complexa. Este tipo de degradação é muito comum e altera gravemente as espécies fotográficas pois, para além de afetar os materiais constituintes dos mesmos, na maioria das vezes altera irremediavelmente a imagem fotográfica.

No que diz respeito aos ambrótipos, estes são particularmente afetados pela degradação do material base do colódio – o nitrato de celulose (NC) (fig. 1.7).

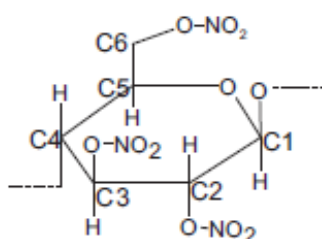


Figura 1.7. Estrutura química do nitrato de celulose (Berthumeyrie *et al.*, 2014).

O NC é um polímero sintético derivado da celulose com propriedades pouco estáveis e apresenta um carácter tóxico e extremamente inflamável. O NC resulta da modificação química da celulose através de um processo denominado nitração que se baseia na adição de ácido nítrico, ácido sulfúrico (catalisador da reação) e água à celulose, ocorrendo substituição dos grupos hidroxilo (OH) por ésteres de nitrato (RONO₂) (Giacomucci *et al.*, 2012, Freedman *et al.*, 2000). Quanto maior for o grau de substituição, mais instável se torna o composto. A sua degradação é geralmente um fenómeno autocatalítico já reportado por alguns autores (Berthumeyrie *et al.* 2014; Ciliberto *et al.* 2013; Quye *et al.* 2011). Se todos os grupos hidroxilo de cada unidade de glucose forem substituídos por grupos nitro (NO₂), o composto terá o teor máximo em azoto que corresponde a 14,4% (Berthumeyrie *et al.*, 2014; Fernandez de la Ossa *et al.*, 2011) dando origem à trinitrocelulose. Segundo Berthumeyrie e colaboradores (2014), para a produção de filmes fotográficos e tintas o NC utilizado tem normalmente um conteúdo de azoto entre 11% e 12%.

Selwitz (1988) considera que os três principais processos de decomposição do NC são o hidrolítico, o térmico e o fotoquímico. Os processos de decomposição primária baseiam-se na libertação de dióxido de azoto (NO₂) que atua como catalisador da reação de decomposição de NC e promove a quebra da estrutura do composto o que leva a uma reação de cisão em cadeia (Quye, 2011; Selwitz, 1988). Já numa segunda fase de decomposição, o dióxido de azoto atua como agente oxidante e as reações ocorrem a uma velocidade superior relativamente à fase primária, sobretudo quando o composto está exposto à luz e a temperaturas mais elevadas. A exposição a temperaturas elevadas promove a redução do dióxido de azoto a óxido nítrico (NO) e formação de um átomo de oxigénio em estado singleto, sendo estas duas espécies altamente reativas. Shashoua e colaboradores (1992) referem que na sequência da oxidação fotoquímica pode resultar a hidrólise do éster de nitrato bem como a formação de radicais RCOH[•]. Quye e colaboradores (2011) através de um estudo de simulação constataram que oscilações nos níveis de humidade também influenciam negativamente a

estabilidade do composto, contribuindo para alterações de cor visíveis e um aumento da sua instabilidade. Por conseguinte, a exposição a níveis de humidade elevados resulta na formação de uma emulsão viscosa e aderente ao contrário do que acontece em ambientes demasiados secos, em que a emulsão se torna quebradiça. Nestas situações é facilmente detetado o odor a ácido nítrico (que é libertado aquando a decomposição do nitrato de celulose), mas a imagem permanece decifrável. Por outro lado, Springate (1997) descreve em cinco fases a degradação do NC de um ponto de vista mais físico, e estas incluem, alterações cromáticas que variam do amarelo ao castanho-escuro, a formação de canais ou reticulações, formação de bolhas ou espuma sobre a superfície dos objetos, micro-contracção da superfície e consequente aumento da fragilidade. Todas estas fases são acompanhadas pela presença de um odor desagradável do qual é responsável a libertação de gases (óxidos de azoto).

Relativamente aos negativos de gelatina e prata, as deteriorações mais frequentes acontecem essencialmente na gelatina. A gelatina é uma mistura de polipéptidos de elevado peso molecular produzidos a partir de colagénio (Lopez-Otin & Bond, 2008). Apesar de ser um material inerte, é muito sensível a variações de humidade e temperatura cuja estabilidade varia inversamente com a presença de humidade relativa e oscilações de temperatura (Di Pietro, 2002). As variações deste parâmetro podem provocar defeitos elásticos na estrutura da gelatina pois, sendo um material higroscópico, vai absorver vapor de água em caso de humidade elevada e liberta aquando da diminuição da mesma. A temperatura a que os negativos de gelatina são expostos é também um parâmetro crucial que pode influenciar negativamente a estabilidade física e química da gelatina, pelo que flutuações extremas de temperatura provocam a expansão ou a contracção do composto.

A oxidação da prata, mais conhecida por espelho de prata é uma das deteriorações químicas mais comuns e também mais prejudiciais, que ocorre em ambos os géneros fotográficos. Desde 1963 que existe um modelo descritivo da formação de espelho de prata e denomina-se modelo de oxidação-migração-re-agregação. Segundo este modelo, o primeiro passo na formação de espelho de prata é a oxidação das partículas formadoras de imagem (Di Pietro, 2002; Di Pietro & Ligterink, 2002). Na literatura são assinalados alguns gases com capacidade oxidante, tais como o oxigénio (O_2), óxido e dióxido de azoto (NO , NO_2), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), entre outros (Nishimura, 1993; Ahmed Ali *et al.*, 2002). O H_2O_2 é de todos o mais relevante pois é libertado em processos que envolvem a degradação de materiais celulósicos. Segundo Di Pietro (2004), este gás é dissolvido na água contida na emulsão fotográfica e reage com a prata. A sua reacção com a prata resulta na formação de iões prata metálica. Para além dos gases, oscilações de humidade e temperatura instáveis são também apontados como parâmetros causadores da formação de prata metálica (Reilly *et al.*, 1988). Neste processo, a prata é oxidada a iões prata metálica (Ag^+) que migram para a superfície. Os iões prata que sofrerem migração vão difundir-se ao longo da solução e ligar-se ao oxigénio, enxofre, ou outro elemento que esteja presente para formar um composto de prata estável e prejudicial à imagem (Nishimura, 1993). Di Pietro (2002) refere este processo de degradação, afirmando que a oxidação das partículas de prata e a subsequente redução da sua dimensão e formação de iões prata metálica na emulsão são a base de diferentes tipos de degradação visíveis, mas sublinha que o modelo apresentado não permite determinar viavelmente a taxa de formação de espelho de prata pois não permite avaliar as reacções envolvidas no modelo e para além disso, numa emulsão fotográfica as reacções também dependem da natureza específica dos diferentes gases (peróxido de hidrogénio, sulfureto de hidrogénio, vapores sulfurosos, entre outros) e da natureza e condição dos compostos de prata da emulsão (prata metálica, sais de prata e prata filamentosa ou coloidal). Martina e colaboradores (2012) refere também que a utilização de produtos como o tiosulfato é responsável pela presença de sulfatos na superfície da emulsão que ao reagirem com os

iões prata metálica vão formar compostos como o sulfito de prata (Ag_2SO_3), sulfato de prata (Ag_2SO_4) e o sulfureto de prata (Ag_2S). A presença destes compostos na superfície dos espécimes resulta no aparecimento de uma cor de chumbo com um brilho metálico que afeta irremediavelmente a imagem, causando a sua perda parcial ou total.

1.3.2. BIODEGRADAÇÃO /BIODETERIORAÇÃO

A biodegradação/biodeterioração é o resultado da atividade metabólica de comunidades microbianas compostas por líquenes, fungos e/ou bactérias. A colonização microbiana e efeitos da mesma é um problema comum em coleções fotográficas e tem sido considerada uma das suas principais causas de deterioração (Lourenço & Sampaio, 2009).

No caso do colódio húmido e dos negativos de gelatina, os materiais orgânicos e inorgânicos que constituem estas espécies (p.e., suporte, emulsão, vernizes, entre outros) representam potenciais fontes de micronutrientes que podem vir a possibilitar a colonização por microrganismos. No entanto, a colonização só ocorrerá se as condições envolventes forem favoráveis ao desenvolvimento e proliferação de agentes microbianos e poderá iniciar-se no suporte e estender-se até à imagem e restantes materiais ou o processo contrário. Segundo Lourenço & Sampaio (2009) a presença de microrganismos em materiais fotográficos pode induzir o aparecimento de manchas e deformações.

Os mecanismos de biodegradação podem ser de naturezas distintas, física e/ou química, influenciando-se ambas mutuamente (Zyska *et al.* 1998), e representam uma ameaça à integridade das espécies fotográficas pois têm uma capacidade degradativa elevada. Os danos causados pela ação física baseiam-se em alterações estruturais e mecânicas do suporte e/ou da imagem. Um dos principais danos que poderá ocorrer pela presença de fungos filamentosos é o aparecimento de micro-fissuras na emulsão, com consequente degradação da imagem e posterior destacamento. Dependendo do grau de desenvolvimento fúngico, pode até ocorrer fragmentação do suporte fotográfico devido à pressão exercida pela penetração de hifas. Segundo Matè e colaboradores (2008) a extensão dos danos está relacionada com a capacidade dos fungos exercerem ações mecânicas degradativas, com a competição entre as diversas espécies microbianas envolvidas e com os materiais constituintes da espécie fotográfica.

Os mecanismos químicos são muito mais complexos e diversos do que os físicos, e estão essencialmente relacionados com a transformação da natureza química das espécies fotográficas. Podem ser distinguidos dois principais processos: assimilação, em que há utilização dos diferentes componentes constituintes do material como fonte nutricional através de atividade enzimática, ou libertação de substâncias metabólicas (Matè *et al.* 2008, Zyska *et al.* 1998). Destes processos resultam normalmente alterações cromáticas como o aparecimento de manchas de diferentes tons, causadas pela produção de pigmentos e ácidos orgânicos que reagem com os compostos presentes nas espécies. Relativamente às duas espécies fotográficas em estudo, os negativos de gelatina são mais suscetíveis de deteriorações microbiológicas do que os ambrótipos. A gelatina é uma substância orgânica e higroscópica tal como o colódio, mas o componente principal deste último é o nitrato de celulose que por si só não é um composto muito suscetível à biodegradação/biodeterioração enquanto o colagénio (proteína estrutural), principal constituinte da gelatina, é uma fonte de nutrientes para microrganismos.

À partida, o processo de deterioração biológica de NC parece ser simples uma vez que este é composto por grupos nitrato que poderiam ser fonte de azoto para as comunidades microbianas. No entanto, de acordo com a literatura, este mecanismo de degradação não aparenta ser direto e são apresentadas opiniões algo contraditórias a seu respeito. Enquanto a celulose é suscetível à

deterioração por fungos e bactérias através de processos de assimilação, a degradabilidade do NC por estes processos tem vindo a ser questionada. Segundo Giacomucci e colaboradores (2012) os microrganismos têm capacidade de degradar o NC através de dois mecanismos distintos: a clivagem das ligações β -1,4-glucosídicas com produção de nitro-oligosacáridos, que é também reportada por Pfeil (1999) e, por outro lado, a desnitrificação do NC que consiste na redução biológica de nitratos ou nitritos a azoto molecular em ambiente anóxico, levando a uma redução do grau de substituição de grupos nitro do composto. Este último mecanismo é normalmente utilizado por bactérias. No que diz respeito ao primeiro mecanismo, este é conduzido por enzimas que pertencem ao complexo enzimático da celulose (complexo celulolítico), celulasas, que promovem a hidrólise de materiais celulósicos. As celulasas dividem-se em três grupos, as endoglucanases (E.C.3.2.1.4), exoglucanases (E.C.3.2.1.91) e β -glucosidases (E.C.3.2.1.21). O grupo das exoglucanases é constituído pela celobiohidrolase (CBH), que está envolvida na degradação do NC. A CBH (EC 3.2.1.91), cujo nome sistemático é 4- β -D glucanacelobiohidrolase, participa na hidrólise primária da fibra celulósica e pode ser dividida em celobiohidrolase I e celobiohidrolase II que atuam na extremidade redutora e não redutora da cadeia de trinitrocelulose, respetivamente, rompendo as ligações β -1-4-glucosídicas (Zhang *et al.*, 2006), ocorrendo assim da macromolécula.

Relativamente à desnitrificação da NC (com quebra da cadeia lateral da celulose), é um processo que envolve a redução de nitrato a nitrito e a subsequente redução de nitrito a amónio pela ação de nitrato e nitrito redutases (Giacomucci *et al.*, 2012). Na figura 1.8 encontra-se uma representação das reações biológicas envolvidas na remoção ou fixação de azoto.

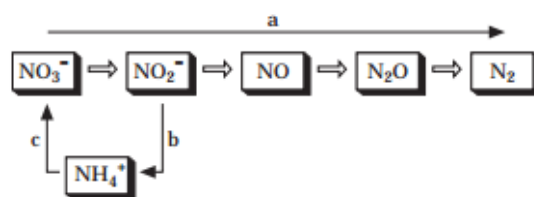


Figura 1.8. Representação parcial do ciclo biológico do azoto. a) desnitrificação; b) dissimilação (produção de amónio); c) nitrificação. (Moura *et al.*, 1997).

Brodman & Devine (1981) elaboraram estudos de simulação em que induziram contaminações artificiais a espécies preparados a partir de NC e relatam que aparentemente os microrganismos utilizam azoto como substrato para crescimento e desenvolvimento atacando, desta forma, o NC. Por outro lado, Sharma e colaboradores (1995) obtiveram resultados que indicam que microrganismos celulolíticos e desnitrificantes têm capacidade de crescimento em NC e que, além disso, têm uma significativa capacidade degradativa.

Quando a gelatina é o ligante da emulsão fotográfica, a ocorrência de fenómenos biodegradativos é superior quando comparada com NC, uma vez que a gelatina é o mais biodegradável dos substratos (Lourenço & Sampaio, 2009). Existe uma enorme diversidade de microrganismos procariotas e eucariotas que exibem atividade proteolítica e gelatinolítica, ou seja, que têm capacidade para degradar a gelatina através da hidrólise por enzimas intra e extracelulares. Os componentes estruturais do sistema proteolítico podem ser divididos em três grupos, com base nas suas funções: as proteases, que quebram as proteínas em peptídeos; um sistema de transporte que

conduz estes produtos através da membrana citoplasmática e proteases que formam aminoácidos livres por degradação dos peptídeos (Mayo *et al.* 2010). As proteases (E.C.3.4.) representam um grupo de enzimas frequentemente associadas à biodegradação/biodeterioração da gelatina através da quebra de ligações peptídicas que a constituem. Este grupo de enzimas pertence à subclasse das peptídeo-hidrolases que constituem uma família que se subdivide nas exopeptidases (E.C.3.4.11-19) e endopeptidases (E.C.3.4.21-99) de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada (Beynon & Bond, 1989). As exopeptidases dividem-se entre as aminopeptidases e carboxipeptidases que atuam sobre as ligações peptídicas terminais libertando grupos amina (NH₂) e carboxilo (COOH), respetivamente. Relativamente às endopeptidases, estas atuam sobre as ligações peptídicas internas, provocando a hidrólise da macromolécula em dois passos sequenciais: inicialmente a gelatina é hidrolisada em polipéptidos e estes, convertidos em aminoácidos, serão usados nos processos metabólicos das células de microrganismos (López-Otín & Bond, 2008; Garcia-Carreno & Del Toro, 1997). Abrusci e colaboradores (2006) relatam que num estudo de biodegradação/biodeterioração em películas cinematográficas à base de gelatina verificaram a presença de diferentes espécies de bactérias, com capacidade de produção de gelatinases, e várias estirpes fúngicas também apresentam elevada capacidade biodegradativa/biodeteriorativa. Bingley & Verran (2013) isolaram microrganismos também provenientes de películas cinematográficas à base de gelatina e verificaram que a maior parte dos isolados tinha capacidade gelatinolítica para além de constatarem também o crescimento de hifas e proliferação das mesmas sobre estes filmes, provocando danos físicos graves.

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS NA CARACTERIZAÇÃO MATERIAL

Atualmente existe uma enorme variedade de complexas ferramentas para a aquisição de informação quantitativa e qualitativa sobre a composição e estrutura da matéria.

Tendo em conta a importância da fotografia e sabendo que esta tem uma das funções sociais mais válidas desde os primórdios da humanidade - o registo e imortalização de momentos passados - o estudo de espécies fotográficas é de extrema importância para identificação das características dos materiais utilizados na sua produção e processos de deterioração. É essencial a utilização de técnicas analíticas complementares e abordagens multidisciplinares para promover o conhecimento científico indispensável para encontrar respostas a questões emergentes que permitem melhorar a conservação de fotografia e, consequentemente, a sua preservação.

1.4.1. FOTOGRAFIA TÉCNICA

O recurso à fotografia técnica permite o registo e a observação detalhada das espécies fotográficas, nomeadamente o seu estado de conservação, patologias (alterações topográficas, morfológicas e cromáticas) bem como pormenores acerca dos processos de produção. A obtenção de imagens das espécies fotográficas pode ser feita através da utilização de diferentes tipos de iluminação, tais como, luz refletida, transmitida, rasante e radiação ultravioleta (UV). A utilização de luz transmitida permite uma avaliação mais detalhada da imagem representada, das patologias e retoque, quando presente. A luz rasante permite obter informação sobre a morfologia e topografia, e torna mais evidentes os defeitos superficiais. No espetro eletromagnético, a luz visível situa-se entre os comprimentos de onda 400-800 nm enquanto a radiação UV corresponde ao intervalo 180-400 nm

e subdivide-se em comprimento de onda longo UV-A (400-320 nm), médio UV-B (320-280 nm) e curto UV-C (280-185 nm) (Williams & Williams, 1994).

Uma das principais vantagens da fotografia com radiação UV refletida é o registo da reflexão e absorção desta radiação pelo objeto fotografado. Por vezes não é possível verificar determinadas características dos objetos fotografados com luz natural que através da utilização de radiação UV, verificam-se características individuais dos materiais. Este tipo de fotografia oferece uma interpretação visível do que parece invisível, tais como materiais orgânicos, nomeadamente, vernizes e resinas e respetivos produtos de degradação (Williams & Williams, 1994). A presença de material biológico é também discriminável pela utilização de radiação UV o que a torna uma ferramenta essencial para perceber se existe, ou não, contaminação microbiológica.

1.4.2. MICROSCOPIA ÓTICA

A microscopia ótica é uma técnica primária de exame visual de espécies fotográficas e de caracterização dos seus componentes. A utilização desta técnica permite a aquisição de resultados importantes para posterior seleção das técnicas analíticas a usar na caracterização do objeto.

A observação pode ser feita através de luz transmitida e/ou refletida ou ainda por estereomicroscopia em que se obtêm imagens a três dimensões. Os tipos de microscopia que podem ser utilizados variam desde o campo claro, campo escuro, microscopia de contraste de fase, fluorescência, entre outros. Os mais comumente utilizados são as microscopias de campo claro e de campo escuro. A microscopia de campo claro permite que a luz atravesse ou seja refletida pela amostra. A iluminação é projetada ao longo do eixo ótico, através da objetiva em direção à amostra em estudo, a qual irá ser atravessada pela luz ou refletir a mesma (Murphy, 2001). Relativamente à microscopia de campo escuro, a iluminação é direcionada para o exterior do cone que a objetiva compreende e apenas a luz que é difratada ou refletida pela amostra é utilizada para formar imagem (Araújo, 2007; Murphy, 2001). A iluminação de campo escuro aumenta a visibilidade de detalhes estruturais que dificilmente se observam através da iluminação de campo claro.

Um microscópio ótico é constituído pela parte mecânica (componente de suporte) e ótica onde se apresentam dois sistemas de lentes convergentes, a objetiva e a ocular. A objetiva é um conjunto de lentes que apresenta pequena distância focal e que fornece uma imagem real e aumentada das amostras observadas. A ocular, também formada por lentes convergentes, funciona como uma lupa, que origina uma imagem virtual e aumentada da imagem real que se formou pela objetiva. As características a sublinhar num microscópio são o poder de resolução, que é a capacidade que o microscópio possui para distinguir dois pontos adjacentes e ainda a abertura numérica que representa a medida da capacidade de uma lente para receber informação (luz) de uma amostra e é definida pela equação: $AN = n \sin \alpha$, onde n representa o índice de refração do meio entre a amostra e a objetiva e α é o semiângulo de abertura, formado pelo eixo ótico e os raios externos do feixe de luz que penetram na objetiva (Bittencourt, 2008; Murphy, 2001).

1.4.3. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO E ESPETROSCOPIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (MEV-EDS)

Técnica versátil que se tornou numa das aplicações mais rotineiramente utilizadas para análise de materiais sólidos. A possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que contribuem para a ampla utilização desta técnica.

O microscópio eletrónico de varrimento permite a obtenção de uma imagem que é o resultado da incidência de um feixe de elétrons acelerados num ponto da superfície da amostra e na subsequente recolha dos sinais eletrónicos emitidos por essa amostra. Os elétrons interagem com a amostra através de uma variedade de diferentes mecanismos que produzem um conjunto complexo de sinais, que incluem, elétrons retrodifundidos, secundários, raios-X característicos, entre outros (Carlton, 2011). A principal diferença entre o sinal de elétrons secundários (elétrons de baixa energia (<50 eV)) e retro-difundidos (energia elevada próxima dos elétrons primários), é que o primeiro resulta de interações inelásticas e produz uma imagem que permite visualizar a morfologia da superfície e respetivas características da amostra enquanto o segundo resulta de interações elásticas e fornece informações acerca da distribuição elemental da mesma (Carlton, 2011; Stuart, 2007). A resolução espacial é regulada pela penetração e propagação do feixe de elétrons na amostra.

O microscópio eletrónico de varrimento pode ser acoplado a um sistema de espectroscopia de raios-X por dispersão em energias (EDS) que recorre ao espectro de raios-X emitido por uma amostra quando bombardeada por um feixe focado de elétrons para se obter uma análise química localizada. O sistema de EDS mede a energia dos raios-X que são gerados e produz um espectro que relaciona intensidade com energia (Carlton, 2011).

A microscopia eletrónica de varrimento é utilizada na caracterização de diferentes materiais (orgânicos e inorgânicos). A técnica pode ser qualitativa, ou seja, informa acerca da distribuição espacial dos elementos químicos presentes na amostra, semi-quantitativa, que passa pela quantificação desses elementos químicos através de um método sem padrões e por último, quantitativa que resulta da determinação das percentagens dos elementos por microanálise de raios-X a partir da medição da superfície dos picos previamente identificados. Este equipamento proporciona também uma distribuição espacial dos elementos por meio de mapas elementares. Quando as amostras são não condutoras é necessário revesti-las com uma fina camada de material condutor que é geralmente ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd), platina (Pt), entre outros.

Por norma, esta técnica é não destrutiva e permite análises *in-situ* sem recurso a amostragem o que a torna não invasiva.

1.4.4. MICRO ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHOS COM TRANSFORMADA DE FOURIER (μ -FT-IR)

A radiação infravermelha (IV) é luz não visível pois o seu comprimento de onda não é detetado pelo olho humano. A região do espectro eletromagnético que compreende a radiação infravermelha compreende os números de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} e os raios IV são geralmente divididos em três intervalos, de acordo com os valores de comprimento de onda: curtos, médios ou longos. É na região de IV médio que se incide o foco de maior interesse num espectro de infravermelho e é também denominada por região de “impressão digital” (Silverstein, *et al.* 2005). Para um composto apresentar um espectro de absorção ativo na região do infravermelho, é

necessário que a frequência da radiação seja igual à frequência de vibração da molécula, ou seja, igual à diferença entre estados excitado e fundamental, ou que a frequência de vibração produza alteração do momento dipolar. Para ocorrer absorção por parte de uma molécula, é necessário que a radiação incidente na mesma provoque excitação vibracional, de maneira a que a energia corresponda à diferença de dois estados energéticos vibracionais (Naes et al., 2002). Ao absorver radiação de infravermelhos (IV) vai verificar-se uma transição entre os níveis de energia vibracionais, que mediante a frequência e quantidade da mesma, pode indicar qual o tipo e número de ligações entre átomos e grupos funcionais. O tratamento matemático da transformada de Fourier origina a conversão do interferograma num espectro de bandas que posteriormente é utilizado para a identificação da amostra analisada (Leng, 2008; Silverstein, *et al.* 2005). A técnica de reflexão total atenuada (ATR) baseia-se no princípio de reflexão total. Quando a radiação é propagada de um meio opticamente mais denso (índice de refração n_1) para um outro meio de índice de refração inferior (índice de refração n_2 , $n_1 > n_2$) vai ocorrer reflexão total interna na interface de ambos os meios caso o ângulo da radiação incidente (θ) exceda o ângulo crítico (θ_c). O ângulo crítico pode ser definido como uma função dos índices de refração dos dois meios:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)$$

Na interface entre dois materiais com índice de refração diferente, a radiação incidente é, em parte, refletida e refratada. No ponto de reflexão o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra. A radiação de penetração é chamada onda evanescente. A onda é refletida pela amostra com uma atenuação nas regiões do espectro em que a amostra absorve energia e ao reentrar no cristal altera o sinal modulado pelo interferograma, dando assim informação sobre a superfície da amostra (Stuart, 2007).

Uma das principais vantagens da espectroscopia de ATR é o facto de os espectros de absorção poderem ser obtidos em amostras altamente absorventes e/ou dispersivas, tais como líquidos ou amostras em pó. Sublinhe-se ainda a rapidez e facilidade de execução e a sua sensibilidade.

1.4.5. MICRO ESPETROSCOPIA DE RAMAN (μ -RAMAN)

Ferramenta essencial para estudos a nível molecular que tem vindo a ser muito utilizada no estudo do património cultural devido à sua natureza, em geral, não destrutiva, à possibilidade de análises *in-situ* e à sua elevada resolução espectral ($\geq 1 \text{ cm}^{-1}$). A versatilidade da técnica aumenta com o acoplamento de um microscópio ótico para que as análises sejam mais precisas e localizadas (Smith & Clark, 2004).

A espectroscopia de Raman baseia-se na determinação da luz dispersa por um material ao incidir sobre ele um feixe de luz monocromático, mais especificamente, quando se dá a interação, as moléculas atingem estados excitados instáveis e regressam ao estado fundamental através do fenómeno Rayleigh, Stokes e de anti-Stokes. Os últimos dois fenómenos envolvem deslocamentos em relação à frequência de excitação, associados às frequências de vibração e rotação de átomos e moléculas. No fenómeno de Stokes o fóton libertado apresenta uma frequência menor que a do feixe incidente, o que significa que ocorreu transferência de energia do fóton para a molécula. Caso contrário, se o fóton libertado possuir uma frequência superior que a do feixe incidente significa que

a energia foi transferida da molécula para o fóton (fenómeno anti-Stokes) (Janssens & Van Grieken, 2004; Smith & Clark, 2004).

A análise por μ -Raman apresenta inúmeras vantagens tais como uma boa resolução espacial, sensibilidade e capacidade de resistência a interferências. Uma das limitações desta técnica e que ocorre com mais frequência é a fluorescência que pode ser proveniente de impurezas ou nas características intrínsecas das amostras.

1.4.6. ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)

A espectroscopia de UV/Vis utiliza a radiação na faixa de energias do visível (400-800 nm) e ultravioleta (300-400 nm) onde as moléculas sofrem transições eletrônicas (Fig. 1.9) que ocorrem por interação da fonte radiação com o meio absorvente, ou seja, a técnica envolve a absorção de radiação UV/Visível por uma molécula, promovendo a passagem de um elétron desde uma orbital molecular de menor energia para uma orbital de maior energia. Assim sendo permite estudar a absorção de radiação UV/Vis das soluções em função do comprimento de onda.

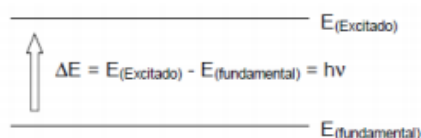


Figura 1.9. Processo de transição de um elétron a um estado excitado (Skoog, *et al.* 2002).

Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte dessa radiação é absorvida pela solução e a restante é transmitida. A absorção de luz depende basicamente da concentração das moléculas absorventes e da espessura da solução – percurso ótico. A espectroscopia de absorção molecular no UV/Vis pode ser usada na quantificação de um analito em solução, baseando-se para tal na lei de Lambert-Beer:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$$

em que A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, b é a distância percorrida pelo feixe através da amostra e c a concentração da espécie absorvente. A relação $A = \epsilon bc$ é geralmente linear sobre a faixa de concentração adequada para análise. Para determinar a concentração de amostras desconhecidas, é construída uma curva de calibração utilizando soluções com concentrações conhecidas. A espectroscopia de UV/Vis é muito utilizada para determinações analíticas em diversas áreas e é bastante útil para a identificação de grupos funcionais na molécula e pode ser usada na análise tanto de compostos orgânicos como inorgânicos (Skoog, *et al.* 2002).

1.4.7. MICRO-DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (μ -DRX)

A difração de raios-X é uma técnica principalmente utilizada na caracterização de fases cristalinas de materiais cristalinos ou semi-cristalinos. A DRX baseia-se no fenômeno de interação entre um feixe de raios-X e os elétrons de átomos constituintes de um determinado material. Com

base nos conceitos da física ondulatória, quando a radiação eletromagnética de raios-X se propaga num material podem ocorrer três fenômenos mas apenas um resulta no fenômeno de difração, o espalhamento. Um feixe de raios-X monocromático quando incide numa estrutura cristalina com um ângulo θ é difratado pelos átomos que estão no plano superficial, assim como, pelos átomos dos planos subjacentes com o mesmo ângulo de incidência (Figura 1.10). Portanto, o ângulo entre o feixe incidente e o feixe difratado é 2θ , e quando a diferença de caminho ótico entre os feixes difratados pelos diferentes planos for um múltiplo inteiro do comprimento de onda da radiação incidente, a interferência é construtiva, gerando um pico de difração (Pecharsky, 2009). Se os átomos desse material se encontraram ordenados no espaço (característica das estruturas cristalinas), o fenômeno da DRX satisfaz a lei de Bragg que pode ser calculada a partir da seguinte expressão:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

onde n é um número inteiro, λ representa o comprimento de onda conhecido do feixe de raios-X incidente, d é a distância interplanar e θ corresponde ao ângulo de difração (Stuart, 2007). Na Figura 1.10 é possível observar um esquema da geometria Bragg-Brentano.

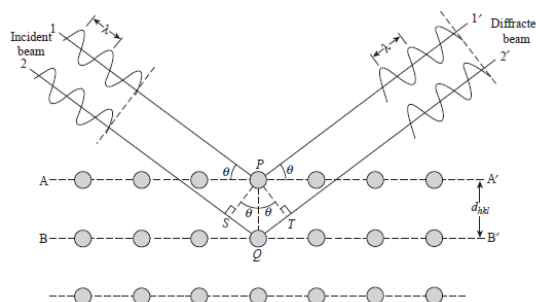


Figura 1.10. Esquema da difração de raios-X (lei de Bragg) (Leng, 2008).

As informações obtidas de cada pico são a intensidade, a posição angular (2θ) ou distância interplanar e o perfil. Cada composto cristalino apresenta um padrão de difração característico, permitindo a sua identificação através das posições angulares e intensidades relativas dos picos difratados por comparação com bases de dados.

As principais vantagens da micro-difração de raios-X são o facto de as análises poderem ser feitas diretamente sobre a amostra descartando a necessidade de uma preparação prévia das mesmas, ser não destrutiva e aplicável numa larga escala de materiais.

METODOLOGIA

2.1. ESTRATÉGIA ADOTADA

A concretização dos objetivos deste trabalho obedeceu ao plano descrito a seguir.

Local de Realização

- Laboratório HERCULES, Palácio do Vimioso
- Laboratório de Biotecnologia, Fase III, Colégio Luís António Verney

Duração

Anos letivos de 2014/2015 e 2015/2016

Amostras em estudo

- ✓ dois ambrótipos do século XIX pertencentes a uma coleção privada;
- ✓ dois negativos de gelatina em suporte de vidro, do século XX, de uma coleção de autoria de Eduardo Nogueira, pertencentes ao Arquivo Fotográfico da Câmara Municipal de Évora;
- ✓ dois ambrótipos contemporâneos cedidos pela Silverbox Studio;
- ✓ dois negativos de gelatina contemporâneos preparados para o efeito.

Modelo biológico

- ✓ culturas mistas de fungos e bactérias obtidas a partir das espécies fotográficas históricos em estudo;
- ✓ estirpes fúngicas isoladas a partir das espécies fotográficas históricas;
- ✓ estirpes bacterianas isoladas a partir das espécies fotográficas históricas;
- ✓ estirpe com atividade celulolítica conhecida *Trichoderma harzianum* CCM1 783.

Ensaios

- ✓ atividade enzimática de celulasas ao fim de 24 h, 48 h, 72h, 96 h, 168h e 240 h;
- ✓ *screening* de atividade proteolítica para os isolados bacterianos provenientes dos negativos de gelatina históricos;
- ✓ determinação de crescimento e viabilidade celular nos ambrótipos contemporâneos inoculados com isolados fúngicos obtidos a partir dos ambrótipos históricos;
- ✓ indução de contaminação microbiana nos negativos de gelatina contemporâneos usando os isolados bacterianos obtidos a partir dos negativos de gelatina históricos.

Técnicas utilizadas

Para a caracterização morfológica, química e microbiológica das espécies fotográficas históricas, das patologias presentes e da biodeterioração induzida nos espécimes contemporâneos foram utilizadas técnicas não destrutivas de análise, como a fotografia técnica sob diferentes iluminações, a microscopia ótica, a microscopia eletrónica de varrimento com microanálise por raios-X em modo de pressão variável (VP-MEV-EDS), a micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μ -FT-IR), a micro-

espectroscopia de Raman (μ -Raman) e a micro-difração de raios X (μ -DRX). Para a determinação da atividade celulolítica foi usada a espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS.

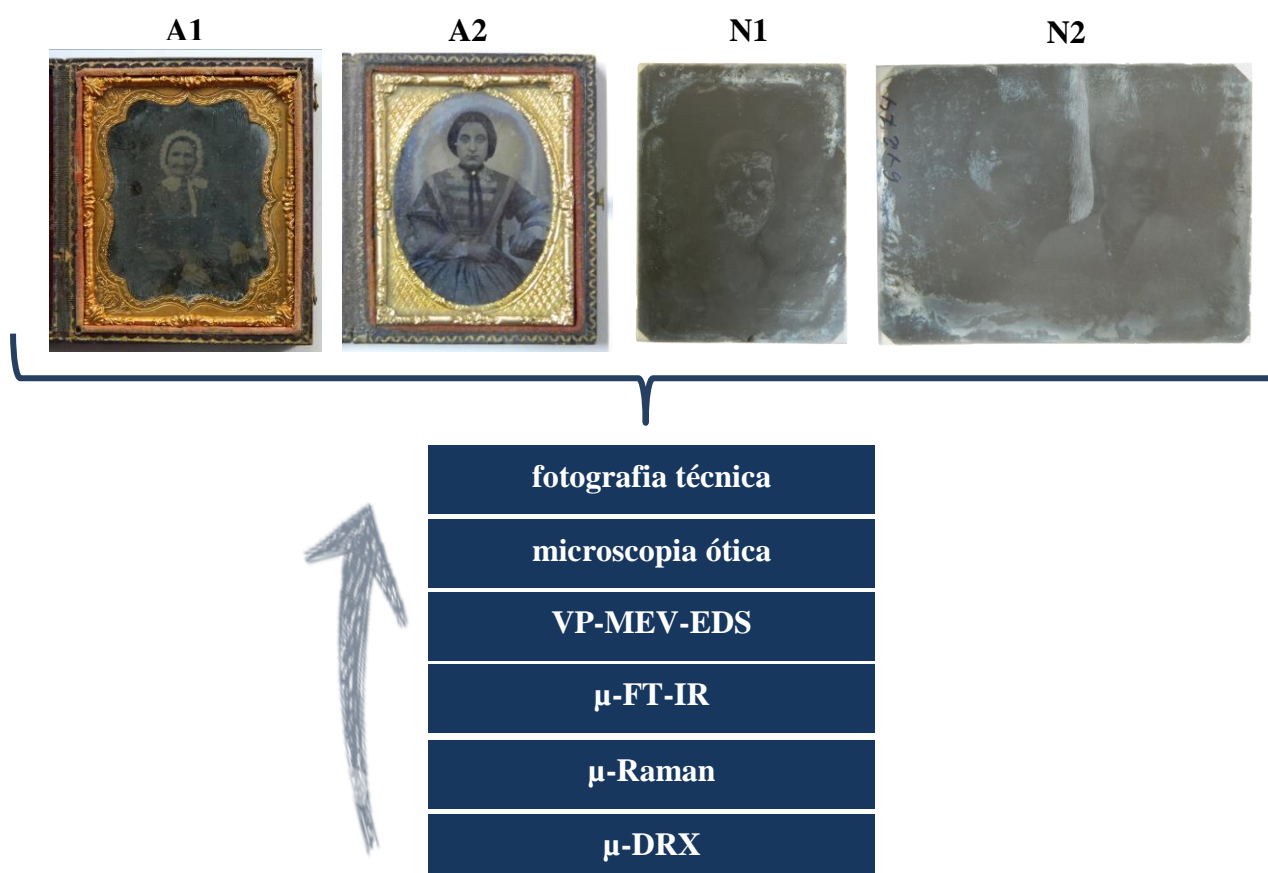
Análise estatística

Na validação estatística dos resultados enzimáticos e de viabilidade celular utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 19, Copyright©, Microsoft Corporation. Foram estudadas as diferenças encontradas nos níveis de atividade do enzima, para todos tempos das culturas, através do teste de análise de variância (ANOVA). O teste de Levene foi utilizado para confirmar a homogeneidade das variâncias e o Teste de Tukey foi utilizado para realizar a comparação múltipla das médias para um nível de significância de 5%.

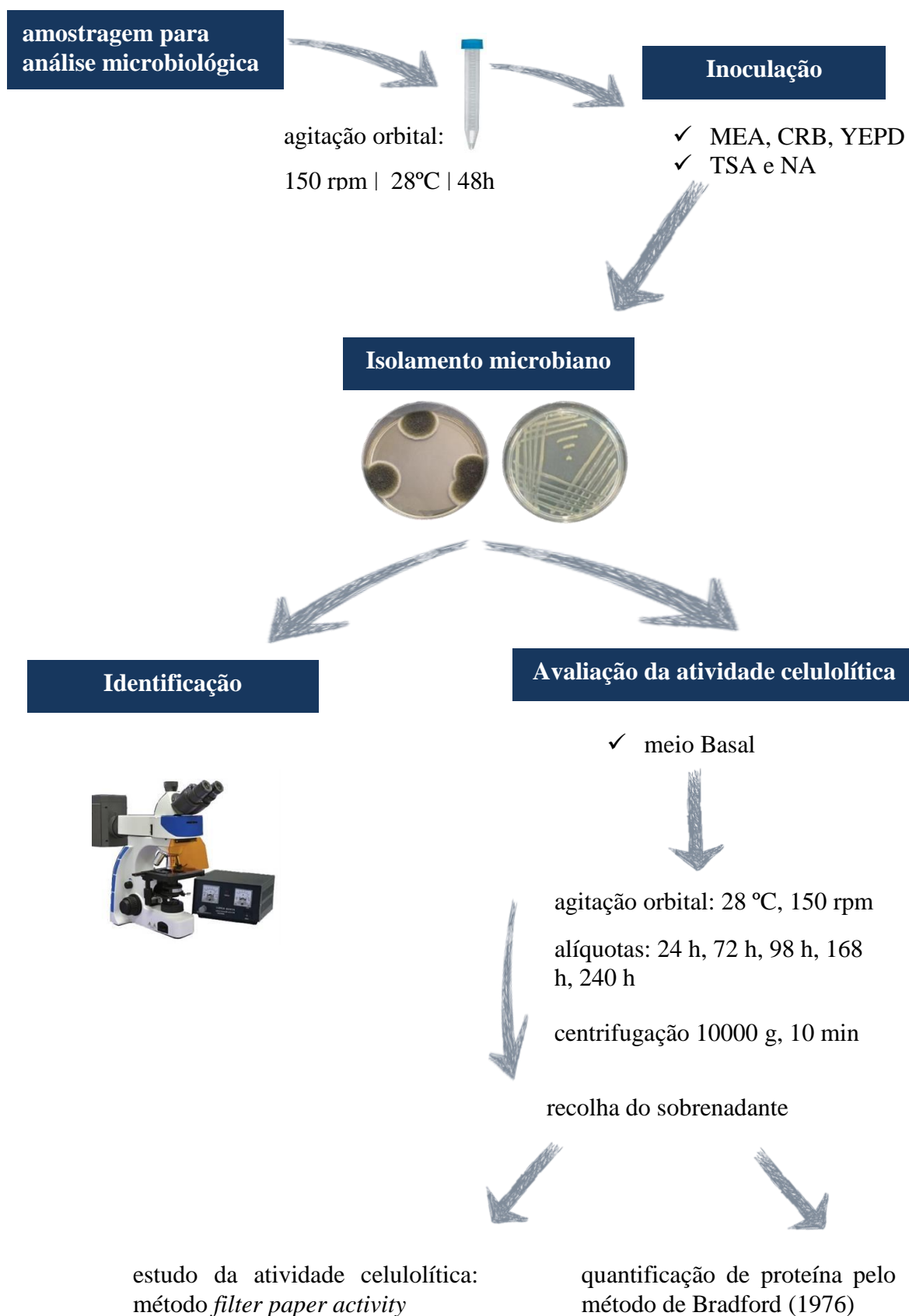
2.2. DIAGRAMA DE TRABALHO

2.2.1. Caracterização material

✓ amostras em estudo:



2.2.2. Caracterização microbiológica e avaliação de atividade celulolítica



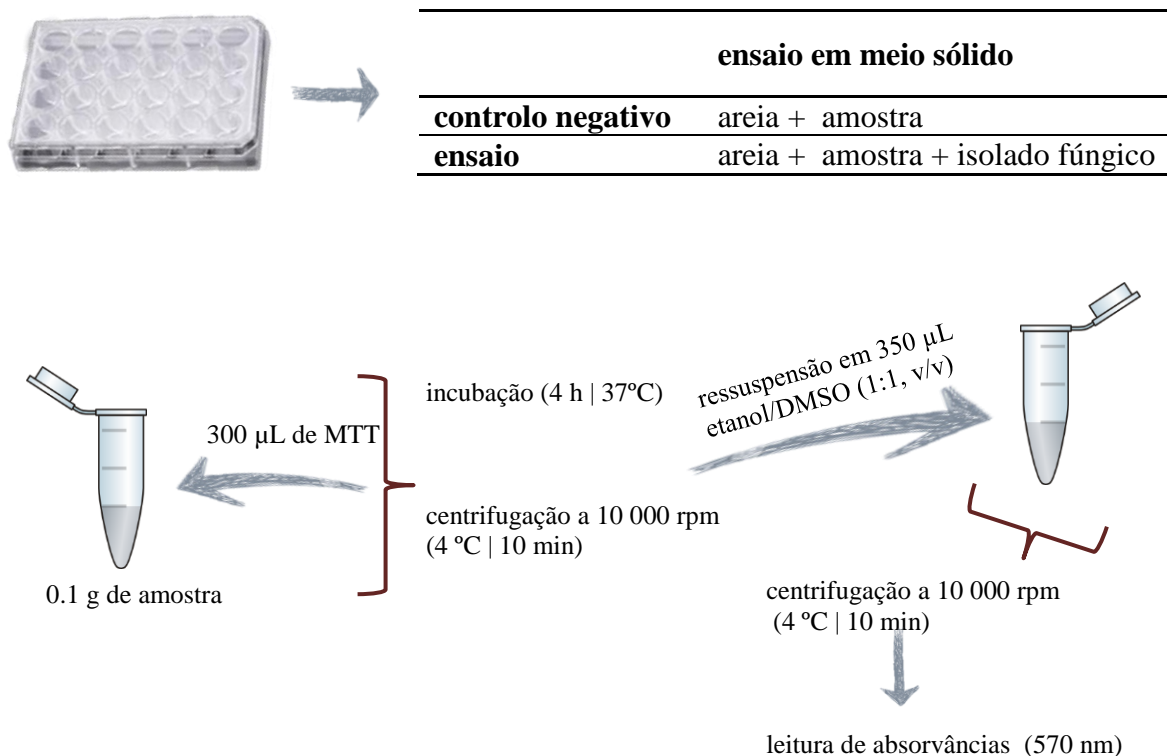
2.2.2.1. Indução de biodeterioração/biodegradação e avaliação do potencial biodeteriogénio dos isolados fúngicos e bacterianos em espécies contemporâneos

i. Ambrótipos contemporâneos - avaliação da atividade celulolítica

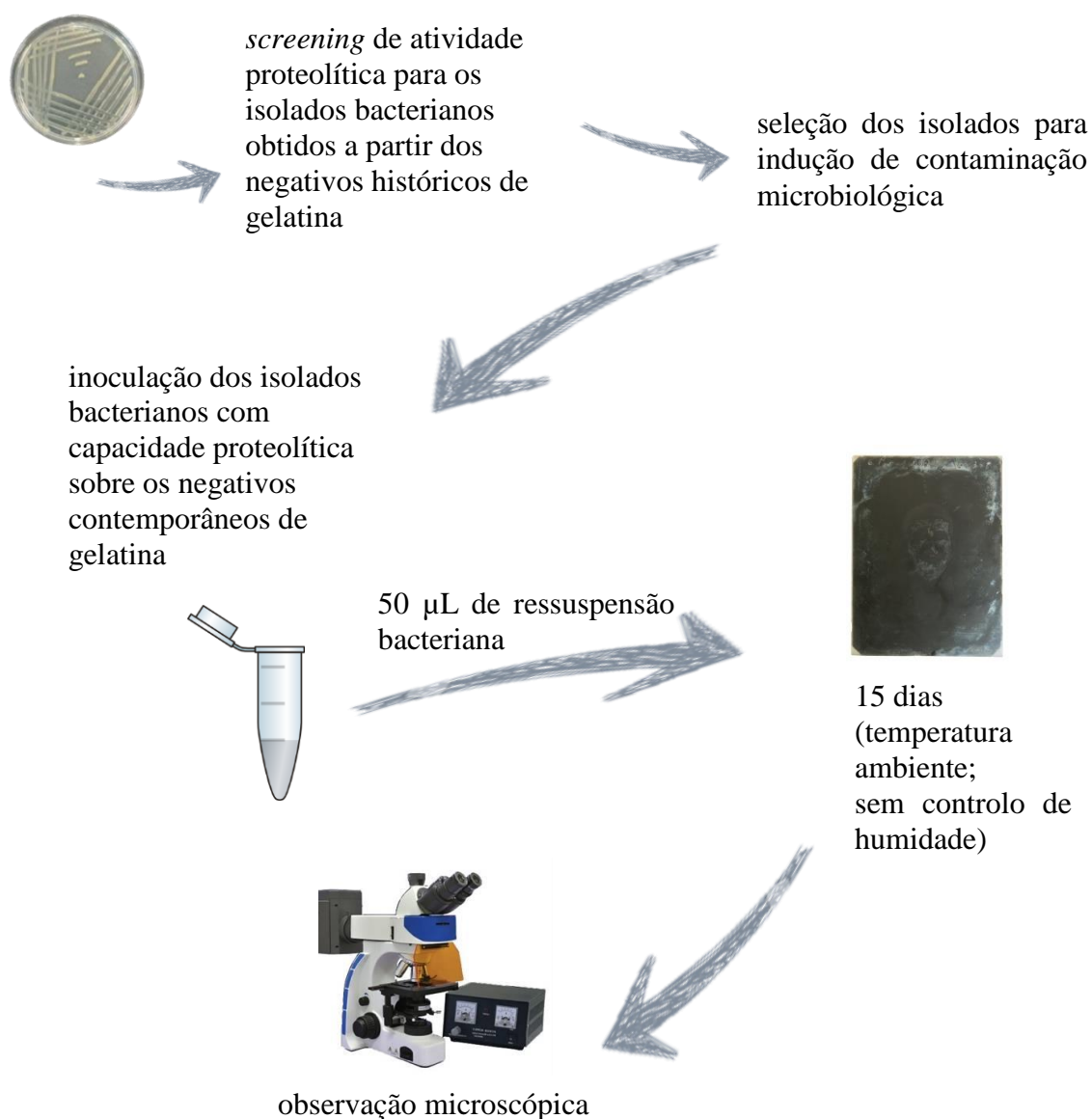
A avaliação da atividade celulolítica neste ensaio foi realizada seguindo o procedimento anteriormente exemplificado (cf. 2.2.2) usando as seguintes condições:

ensaio em meio líquido	
controlo positivo	meio Basal + isolado fúngico
controlo negativo	meio Basal + CMC
ensaio	meio Basal + isolado fúngico + amostra meio Basal + isolado fúngico + amostra + CMC

ii. Ambrótipos contemporâneos - avaliação da viabilidade celular



iii. Negativos de gelatina contemporâneos - avaliação da alteração provocada pela presença microbiana



2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

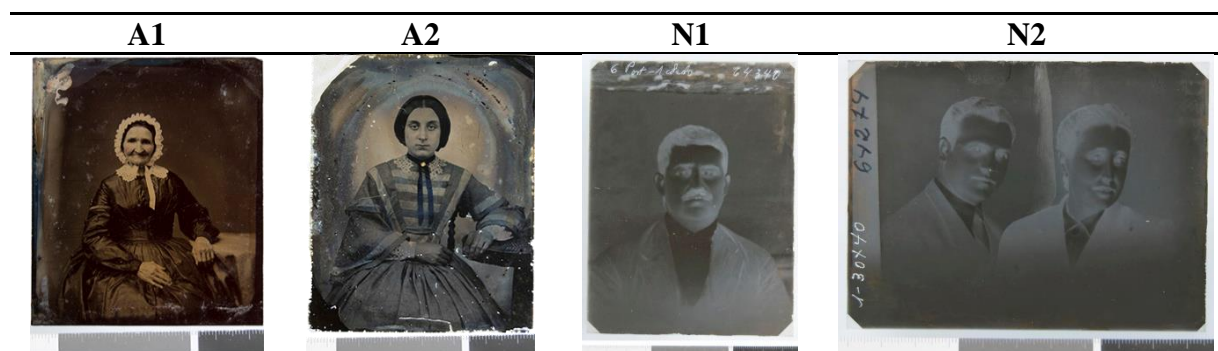
2.3.1. Amostras

2.3.1.1. Espécies fotográficas históricas

Para a realização deste estudo foram selecionadas duas tipologias de espécies fotográficas distintas: dois ambrótipos (A1 e A2) e dois negativos de gelatina em suporte de vidro (N1 e N2) pertencentes, respetivamente, a uma coleção privada e a uma coleção de autoria de Eduardo Nogueira (Arquivo Fotográfico da Câmara Municipal de Évora). Estas espécies fotográficas têm naturezas distintas e apresentam diferentes tipos de patologias. Na Tabela 2.1 são apresentadas as amostras em estudo através de uma imagem fotográfica obtida com luz natural refletida. Aquando adquiridos, os dois ambrótipos encontravam-se intactos e devidamente fechados no estojo protetor. A remoção do estojo foi realizada por uma especialista em conservação de fotografia com recurso a uma câmara de fluxo laminar de modo a garantir todas as condições de assepsia e este processo foi registado em vídeo.

O ambrótipo A1 tem cerca de 7 cm x 4 cm e o A2, 5 cm x 3 cm. Os negativos de gelatina foram cedidos em envelopes próprios. Não se encontravam selados e apresentavam um estado de conservação razoável. Segundo a informação complementar do Arquivo Fotográfico, estes negativos pertencem a uma coleção que tem no total 80 000 espécies fotográficas, pertença de um fotógrafo eborense reconhecido, de nome, Eduardo Nogueira. O formato destes negativos é de 9 cm x 12 cm. Os negativos foram colocados em caixas de espuma de polietileno devidamente adaptadas aos mesmos e forradas com papel japonês para proteção das espécies durante o período de análise.

Tabela 2.1. Imagens fotográficas das amostras em estudo.



2.3.1.2. Espécies fotográficas contemporâneas

Para a realização de ensaios de simulação microbiológicos foram utilizados dois ambrótipos contemporâneos cedidos pela empresa Silverbox Studio e foram propositadamente produzidos para este trabalho quatro negativos de gelatina em suporte de vidro.

2.3.2. Técnicas de caracterização

2.3.2.1. Fotografia técnica

A fotografia técnica foi realizada com o objetivo de obter imagens fotográficas para mais facilmente avaliar as espécies fotográficas bem como os respectivos aspectos morfológicos. A fotografia foi feita sob luz normal refletida, transmitida e rasante. As amostras foram também expostas a radiação UV para verificar a existência ou não de fluorescência. Utilizou-se uma câmara Nikon D3200 com uma lente micro-Nikkor 40 milímetros f/ 2.8DX fixa num suporte. A fonte de radiação UV foi uma lâmpada escura Eastern Corp™ 158A X-4. Foi também usada uma caixa de luz para obtenção de imagens sob luz transmitida. As fotografias em modo de luz normal, transmitida e rasante foram obtidas com ISO 100 e para a radiação UV foi utilizado ISO 200.

2.3.2.2. Microscopia ótica

A análise das espécies fotográficas foi feita usando um microscópio estereoscópico (lupa binocular) Leica M205C para observação da morfologia e cor das amostras bem como eventuais alterações das mesmas. Foi também usado um microscópio ótico de campo escuro (Leica, modelo M2500M) nos modos de luz refletida e transmitida. A ambos os microscópios foi acoplada uma câmara digital Leica DFC 290 HD. Um microscópio ótico de campo claro de marca Leica, modelo M2500P foi utilizado para a observação de culturas microbiológicas e microrganismos.

2.3.2.3. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energias (MEV-EDS)

Esta técnica de análise química elementar é uma das mais versáteis para a observação e caracterização de materiais inorgânicos. A obtenção de informação morfológica na forma de imagens pode ser acompanhada por análises químicas que permitem a obter informação sobre a composição química em % atômica ou % de peso (Smentkowski, 2012). As análises por microscopia eletrônica de varrimento (MEV) e microanálise por raios-X (EDS) foram realizadas usando um microscópio eletrônico de varrimento HITACHI S-3700N com um espectrómetro de raios-X por dispersão em energias Brüker Xflash 5010 acoplado. As análises das espécies fotográficas foram realizadas no modo de pressão variável com uma pressão de 40 Pa na câmara. Relativamente às peças associadas aos ambrótipos (separador e selador) foram analisados em modo de alto vácuo por serem materiais condutores (metal). As imagens foram obtidas em modo de elétrons retrodifundidos e foram realizadas com aceleração de 15 kV enquanto nas análises de EDS foi usada uma aceleração de 20 kV. Para a realização das análises não foi necessária qualquer preparação prévia das amostras.

2.3.2.4. Micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μ -FT-IR)

A elevada sensibilidade, resolução e rapidez de registo tornam a micro-espectroscopia de infravermelho numa das técnicas mais utilizadas na caracterização e identificação de materiais sem que seja necessária uma preparação prévia das amostras. Através desta técnica analítica é possível analisar compostos orgânicos e inorgânicos com base nas suas vibrações moleculares (Smith, 2011).

Para a realização das análises de infravermelho foi utilizado um espetómetro Brüker HYPERION 3000 equipado com um detetor MCT (telureto de mercúrio e cádmio), refrigerado com azoto líquido e uma objetiva ATR de 20x (cristal de Germânio com 80 μ m de diâmetro). Os espectros foram adquiridos no intervalo de números de onda entre 4000 e 650 cm^{-1} com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e resultam da acumulação de 64 varrimentos. Após a obtenção dos espectros, o tratamento e análise dos mesmos foi realizado com auxílio do software OPUS 7.2 da Bruker Optik GmbH Germany.

2.3.2.5. Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman)

A micro-espectroscopia de Raman consiste numa técnica analítica particularmente direcionada para sólidos inorgânicos mas aplicável à maior parte dos materiais. Características como a elevada especificidade molecular bem como a resolução espacial e espectral, a não destrutividade e a possibilidade de análise *in-situ* tornam-na numa das técnicas mais utilizadas na caracterização de materiais (Smith, G., Clark, R., 2004). As análises foram realizadas nas amostras sem qualquer tratamento prévio. Os espectros foram obtidos com um espetrómetro XPlora Horiba Jobin-Yvon equipado com um microscópio ótico de elevada estabilidade OLYMPUS BX41TF e um detetor Ivac CCD. A aquisição dos espectros foi feita com um laser díodo e um de HeNe (hélio néon) com uma potência de saída de 28 e 11 mW a operar a 785 e 638 nm, respetivamente. O feixe de laser foi focado com uma objetiva (Olympus) de 10x (abertura numérica: 0.25) e de 50x (abertura numérica: 0.75). A potência do laser na superfície das amostras variou com o auxílio de um filtro de densidade neutra (densidade ótica de 20%). A resolução espacial foi de 4 cm^{-1} . A aquisição de espectros decorreu no intervalo entre 3000 e 100 cm^{-1} . As amostras foram analisadas com uma potência de laser de 10-25% com ciclos de 5 a 20 s. O tempo de aquisição mais elevado foi utilizado para diminuir a razão entre sinal e ruído. As análises realizaram-se à temperatura ambiente e na ausência de controlo de humidade. A identificação de resultados foi feita comparando as principais características dos espectros obtidos com dados publicados (artigos científicos) ou com recurso à base de dados que acompanha o equipamento (Spectral ID, 2009).

2.3.2.6. Espectroscopia de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

A espectroscopia de absorção molecular na região do UV/Vis tem uma ampla aplicação na identificação e caracterização de materiais orgânicos e inorgânicos. A avaliação da produção de celulasas pelos isolados fúngicos seu e do efeito degradativo e do dos isolados bacterianos foi feita medindo a absorvância ao comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de proteínas totais foi também realizada nas mesmas condições. A determinação de viabilidade celular (MTT) foi medida a 570 nm. Para o efeito foi utilizado um espectrofotômetro de absorção molecular no UV/Vis de marca Thermo Scientific™ que funciona como um leitor de microplacas com capacidade de leitura de 96 a 384 poços e que permite a seleção de um intervalo de comprimentos de onda entre os 200 e os 1000 nm.

2.3.2.7. Micro-difração de Raios X (μ -DRX)

Para a caracterização micro-estrutural dos materiais cristalinos presentes nas amostras uma das principais técnicas utilizadas foi a micro-difração de raios X. Esta é uma técnica analítica não destrutiva para a identificação de fases sólidas (arranjos atômicos) cristalinas em amostras sólidas (Leng, 2010). As análises foram realizadas num difractor Brúker AXS D8 ADVANCE equipado com um conjunto de espelhos Göbel e um detetor LynxEye 1D. Para o estudo foi utilizada a radiação Cu K α ($\lambda_1=1.54056$ Å e $\lambda_2=1.54439$ Å). Para a análise em áreas relativamente pequenas foi utilizado um colimador de 0.3 mm de diâmetro. As análises foram feitas com um varrimento de 3 ° a 75° 2 θ , um passo de 0.05° 2 θ , com um tempo por passo de 1 s e com uma tensão e corrente elétrica de 40 kV e 40 mA, respetivamente.





2.3.3. ESTUDO MICROBIOLÓGICO

2.3.3.1. Caracterização microbiológica

Os diversos microrganismos diferem entre si quanto às necessidades nutricionais e capacidade metabólica e por esta mesma razão o procedimento adotado para a caracterização microbiológica atendeu à enorme variedade e às diferenças da comunidade microbiana geralmente presente no tipo de amostras em estudo. De cada espécie fotográfica (Tabela 2.2) foram recolhidas diversas amostras microbiológicas com recurso a zaragatoas estéreis, humedecidas em água destilada, que foram esfregadas numa área de cerca de 1 cm² da superfície em áreas que apresentavam indícios de contaminação. As amostras recolhidas foram colocadas em meio de ressuspensão (MRD) e submetidas a agitação orbital (150 rpm e 28 °C) durante 48 horas. Após o processo de extração efetuou-se a inoculação (50 μ L) em diferentes meios de cultura seletivos, malte de extrato agar (MEA), rosa de Bengal cloranfenicol (CRB) e extrato de levedura (YEPD), para crescimento fúngico, e nutriente agar (NA) e agar triptona de soja (TSA), para crescimento bacteriano. O procedimento utilizado para a inoculação das culturas foi a técnica de espalhamento. A composição dos meios de cultura utilizados encontra-se descrita no Anexo I. As placas de crescimento

fúngico foram inoculadas a 28 °C, durante 5 a 10 dias e as de crescimento bacteriano a 30 °C, durante 2 a 5 dias. Na tabela 2.1 encontra-se indicada a amostragem realizada em cada amostra.

Tabela 2.2. Áreas selecionadas para amostragem microbiológica.

Áreas de amostragem	
A1	
A2	
Áreas de amostragem	
N1	
N2	

2.3.3.2. Isolamento microbiano

O isolamento microbiano foi feito utilizando placas de Petri com os meios MEA, CRB, YEPD, TSA e NA, referidos no ponto anterior. Após a obtenção das colônias microbianas apenas foram isoladas as que apresentaram morfologias distintas. Foram feitas 3 repicagens de cada colônia seguindo todos os cuidados de assepsia. As estirpes isoladas foram posteriormente inoculadas em rampas com MEA ou NA, consoante o material

biológico, fungos ou bactérias, respetivamente, e armazenadas a 4 °C para posterior utilização.

2.3.3.3. Identificação de isolados microbiológicos

A identificação de microrganismos baseia-se principalmente em características morfológicas e, por isso, a análise dos isolados fúngicos foi realizada por observação macro e microscópica das estruturas reprodutoras, micélios e esporos dos mesmos. Para a sua caracterização foram feitas preparações a fresco utilizando o corante azul-de-metileno que foram posteriormente observadas ao microscópio ótico Motic BA 310 com as objetivas de 10x, 40x e 100x. A identificação de bactérias baseou-se na análise morfológica da célula bacteriana através de técnicas de coloração diferencial (Gram) dos isolados e posterior observação ao microscópio (Motic BA 310).

2.3.3.4. Avaliação da atividade celulolítica

A avaliação da atividade celulolítica foi realizada para os isolados fúngicos provenientes do ambrótipo histórico A1. Utilizaram-se sete isolados fúngicos e uma estirpe com atividade celulolítica conhecida (*Trichoderma harzianum* CCM1 783) de uma coleção de culturas do laboratório de biotecnologia da Universidade de Évora, utilizada como microrganismo de referência. Para a realização do ensaio prepararam-se oito ensaios contendo meio Basal para os quais se arrastou biomassa presente nas rampas onde previamente foram incubados os isolados fúngicos em estudo. As culturas foram incubadas em agitação orbital (28°C e 120 rpm) durante 10 dias. Foram realizadas recolhas de cultura às 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h e 240 h e submetidas a centrifugação de 10000 g durante 10 min. O sobrenadante das culturas foi recolhido e foi determinada a atividade celulolítica pelo método *filter paper activity* (FPA) utilizando o procedimento de Ghose (1987). O substrato utilizado foi papel de filtro Whatman nº1, cortado em tiras de (1x6) cm² com uma massa de aproximadamente 50 mg. O substrato foi colocado em tubos de ensaio, adicionando-se de seguida 1 mL de tampão citrato a 0,05 mol dm⁻³ (pH 4,8) e 0,5 mL de sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A reação enzimática ocorreu a 50 °C, durante 60 min. A quantidade de glucose libertada pela reação com o ácido dinitrossalicílico (DNS) foi doseada com recurso ao método de Miller (1959). Terminada a reação enzimática foram transferidos 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 mL do reagente DNS, que foram posteriormente colocados a 100 °C durante 5 min. De seguida foi adicionado a cada tubo 5,0 mL de água bidestilada. No final, foi lida a absorvância a 540 nm contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento. Foi traçada uma curva de calibração com soluções padrão de glucose com concentrações entre 50 e 1000 mg L⁻¹. O ensaio foi realizado com sextuplicados das amostras e dos padrões. A atividade enzimática foi expressa em atividade celulolítica específica, ou seja, em relação ao conteúdo de proteína total presente no extrato enzimático (U/mg de proteína). O método de Bradford (1976) foi utilizado para a quantificação de proteína. Este é um método colorimétrico utilizado na determinação do teor proteico que se baseia na alteração de cor de um reagente (azul

brilhante de Coomassie G) de castanho para azul após a ligação à proteína. Para o traçado da curva de calibração foram preparadas soluções padrão de BSA (albumina sérica bovina) a 1, 2, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da solução mãe de 2 mg mL^{-1} . A absorvância foi lida ao fim de 10 minutos a 590 nm num leitor de microplacas. As amostras padrões foram preparadas em triplicado. A atividade específica foi expressa por número de unidades de enzima por miligrama de proteína (U/mg proteína).

2.3.3.5. *Screening* de atividade proteolítica

Na tentativa de identificar quais os isolados bacterianos (provenientes dos negativos de gelatina históricos) que apresentavam atividade proteolítica, foi realizado este ensaio com o propósito de selecionar esses isolados para utilizar no ensaio de simulação em negativos de gelatina contemporâneos (cf. 2.3.3.8). Para a realização deste ensaio utilizaram-se nove estirpes bacterianas distintas obtidas consoante os pontos anteriores. Prepararam-se os meios de cultura sólidos e seletivos *Milk 1*, *Milk 2* e Rollei black magic 3 (RBM3) (Anexo I) que foram distribuídos por placas de Petri (Fig. 2.1), nas quais foram inoculadas as estirpes bacterianas e incubadas a 30 °C durante 48 h. Após o término deste período, as estirpes que se desenvolveram foram selecionadas e utilizadas no ensaio de indução de contaminação nos negativos de gelatina contemporâneos.

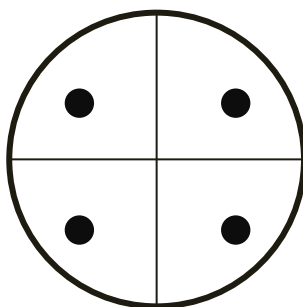


Figura 2.1. Esquema de inoculação dos isolados bacterianos obtidos a partir dos negativos históricos de gelatina.

2.3.3.6. Indução de contaminação microbiológica em ambrótipos

Para a realização deste ensaio foi utilizado um ambrótipo contemporâneo. As espécies foram raspadas do vidro de suporte com o auxílio de um bisturi estéril e os fragmentos foram recolhidos para uma placa de Petri. No total recolheu-se 50 mg de amostra. A amostra foi armazenada em ambiente estéril. Foram preparados dois ensaios distintos com diferentes finalidades; um em meio sólido e outro em meio líquido, tendo-se utilizado em ambos um isolado fúngico (A_{5_{lv}}), proveniente do ambrótipo A1. Este isolado fúngico foi selecionado para a realização dos ensaios por ter apresentado uma atividade celulolítica superior aos restantes que foram estudados. O ensaio em meio sólido teve como propósito a avaliação da viabilidade celular do isolado em estudo e a atividade celulolítica

do mesmo foi testada pelo ensaio de meio líquido. Para ambos foi utilizada uma placa de cultura de células. A placa foi dividida em colunas, nos quais foram colocados:

- (A) controlo negativo com 300 μ L de meio Basal juntamente com a 200 μ L de ressuspensão do isolado fúngico;
- (B) controlo positivo com 300 μ L de meio Basal suplementado com carboximetilcelulose e 200 μ L de ressuspensão do isolado fúngico;
- (C) e (D), inoculou-se o isolado fúngico A_{5_1v} com 3 mg de amostra em meio Basal sem e com adição de carboximetilcelulose (3 mg), respetivamente.
- (E) um controlo positivo com 3 mg de areia à qual foi adicionada 1 mL de ressuspensão do isolado fúngico (A_{5_1v});
- (F) ensaio teste com 3 mg de areia à qual foi adicionado 1 mL ressuspensão do isolado e 3 mg de amostra.

A placa foi selada com *parafilm* e colocada em agitação orbital (120 rpm a 28 °C) durante um período de sete dias, findos os quais se procedeu à avaliação de atividade celulolítica (cf. *i*) e viabilidade celular (cf. *ii*). O conteúdo de cada poço relativo ao ensaio em meio sólido foi ressuspendido para contagem celular. Os ensaios foram montados numa câmara de fluxo de ar laminar para evitar quaisquer contaminações exteriores.

***i.* Avaliação da atividade celulolítica relativa ao ensaio em meio líquido**

A elaboração deste ensaio teve como finalidade verificar se o isolado fúngico utilizado tinha capacidade de produzir celulasas quando inoculado num meio sem suplementação de carboximetilcelulose na presença de uma matriz constituída por um ambrótipo contemporâneo. Em suma, avaliar a capacidade biodeteriogénica do isolado fúngico. Para a realização deste ensaio utilizou-se o isolado fúngico A_{5_1v}. Após do término do ensaio de simulação foi realizado todo o procedimento descrito cf. 2.3.3.4. para a determinação da atividade celulolítica específica do isolado em estudo.

***ii.* Avaliação da viabilidade celular relativa ao ensaio em meio sólido**

Este ensaio permitiu determinar se o isolado fúngico testado se mantém metabolicamente ativo na matriz selecionada (ambrótipo contemporâneo), avaliando desta forma o seu potencial biodeteriogénico. Este método avalia a viabilidade celular que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por meio do enzima mitocondrial desidrogenase em cristais de formazão de cor azul-púrpura. Tal como para o ensaio em meio sólido (ponto *i*) utilizou-se o isolado fúngico A_{5_1v}. Esta avaliação foi realizada apenas para o ensaio de simulação em meio sólido e, para tal, pesaram-se 0,1 g de cada preparação que foram colocadas em microtubos de 2 mL. A cada microtubo foi adicionado 300 μ L de reagente MTT. As amostras foram agitadas durante 30 s em vórtex e incubadas durante 4 h a 37 °C, na ausência de luz numa estufa com temperatura controlada. Findo o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm a 4 °C durante 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Aos microtubos foi adicionado 350 μ L de DMSO/etanol (1:1,

v/v) para dissolver os cristais púrpura de formazão. Para promover a dissolução, os microtubos foram agitados no vórtex durante 30 s e mantidos 10 min à temperatura ambiente. Cada ensaio foi feito em triplicado. Posteriormente, foram pipetados 200 µL do sobrenadante de cada microtubo para uma placa de 96 poços. A absorvância foi lida a 570 nm. A partir do valor de absorvância medido e considerando as diferentes diluições, determinou-se a percentagem relativa de viabilidade celular.

2.3.3.7. Indução de contaminação microbiana em negativos de gelatina

Este ensaio teve como principal objetivo determinar a influência da presença de contaminação bacteriana na estrutura física e morfológica de negativos de gelatina. Para a realização do mesmo, foram preparados negativos de gelatina cujo procedimento é descrito a seguir.

Os reagentes usados na produção dos espécies foram comprados na loja JValles (João Sousa Vales). Foram adquiridos vidros de dimensões 9 cm x 12 cm e com uma espessura de 2 mm. Os vidros foram polidos com uma solução de carbonato de cálcio até que apresentassem porosidade suficiente para receber o revestimento. Após polimento, todo o processo foi realizado sob luz vermelha com ausência total de luz branca. Sobre a superfície dos vidros polidos foi colocada a emulsão comercial RBM3 (de forma a que cobrisse toda a superfície do vidro) e, posteriormente, uma emulsão Rollei black magic 5 (RBM5) para melhorar a aderência da primeira ao suporte. Os vidros emulsionados foram deixados secar durante um período de dois dias, num compartimento de cartão totalmente fechado para impedir a passagem de luz. Após este período, realizou-se a ampliação de negativos de película sob os vidros emulsionados para que se obtivesse a imagem latente. A revelação da imagem foi o passo seguinte e para tal foi usado o revelador AGFA Print WA. Os vidros foram colocados na solução do revelador (permanecendo imersos durante três minutos). A revelação foi parada por aplicação de um banho de paragem de ácido cítrico (Rollei RCS). Posteriormente utilizou-se AGFA Fix–Ag para fixar a imagem. Após a fixação os vidros foram lavados com água corrente e, posteriormente, com água destilada e deixados a secar durante três dias.

A indução de contaminação microbiana foi realizada com os isolados bacterianos (obtidos a partir dos negativos de gelatina históricos) que apresentaram capacidade proteolítica segundo o que foi verificado através do *screening* de atividade proteolítica (cf. 2.3.3.5.). Foi feita uma ressuspensão a partir de culturas frescas dos isolados bacterianos e dessa mesma ressuspensão foram inoculados 50 µL nos negativos contemporâneos numa área interface (entre a área de altas e baixas luzes). Após a inoculação, os negativos permaneceram no mesmo local, protegidos da luz natural direta, a temperatura ambiente e sem controlo de humidade durante 15 dias. Os negativos foram observados à lupa binocular no primeiro dia, antes da inoculação, no sétimo e no décimo quinto dia e ainda por MEV-EDS. A observação dos mesmos permitiu acompanhar o processo e registar as alterações físicas e morfológicas que foram ocorrendo na sua superfície.








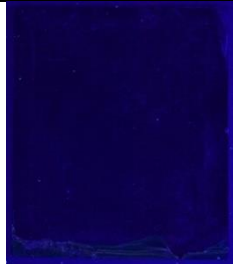







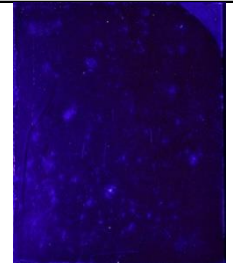
RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização morfológica e química de ambrótipos

3.1.1. Fotografia técnica

Após uma cuidada observação das amostras em estudo, estas foram fotografadas sob diferentes iluminações para permitir uma análise detalhada da morfologia, estado de conservação e patologias presentes. Este registo foi feito sob luz natural refletida, transmitida, rasante e radiação UV, sobre a frente e verso das espécies (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Imagens fotográficas dos ambrótipos A1 e A2 sob diferentes iluminações.

	luz natural refletida	luz transmitida	luz rasante	radiação UV
A1	frente			
				
	verso			
				
A2	frente			
				
	verso			
				

















A utilização de diferentes iluminações permite a recolha de um leque variado de informações. A luz natural refletida oferece uma primeira abordagem que permite a visualização da

imagem positiva evidenciando algumas degradações físicas e alterações cromáticas em ambos os ambrótipos.

De uma maneira geral, A1 encontra-se mais bem conservado que A2 mas ambos exibem abrasão da camada de colódio, destacamentos e manchas diversas na superfície. A utilização de luz transmitida revela o negativo, ou seja, as áreas que na imagem positiva surgem em tons de branco e de preto, na imagem negativa surgem, respetivamente em tons de preto e branco e para além disto, no caso de A2, faz sobressair a presença de abrasão e lacunas do verniz que cobre o verso da espécie com consequente perda do efeito positivo. No caso do ambrótipo A1, a cor avermelhada que se observa é devida à coloração do vidro de suporte, que é um vidro *ruby*. Estes vidros eram utilizados para que não fosse necessário colocar uma superfície escura no verso das espécies para as fazer figurar como positivos. Diferenças de morfologia, presença de irregularidades superficiais, lacunas e acumulações de sujidades são facilmente detetados com a utilização de luz rasante. Sob a radiação UV o A1 apresenta alguma fluorescência nas margens laterais, principalmente na esquerda e à exceção desta, nenhuma outra área parece fluorescer, ao contrário de A2 que apresenta uma cor azul muito mais intensa e mais dispersa, apesar de mais pronunciada também nas margens laterais. A cor azul é mais acentuada nas áreas onde existem manchas na superfície relacionadas com a presença de espelho de prata. Esta degradação é muito comum nas espécies obtidas através deste processo fotográfico e ocorre devido à oxidação da prata. Os iões da prata oxidada migram para a superfície da solução fotográfica e são posteriormente reduzidos a prata metálica ou reagem com enxofre presente em compostos sulfurados provenientes de poluição ambiental, dando origem à formação de sulfureto de prata que pode ser responsável pelo aparecimento de áreas de cor azul acinzentada e brilhante (com aspeto metalizado) prejudicando a imagem (Di Pietro, G. 2002). Este fenómeno, ao contrário do que aparenta, pode não ser fluorescência mas sim reflexão da radiação UV devido ao efeito de reflexo do vidro de suporte (no caso de ausência das camadas adjacentes) ou da presença de espelho de prata. A existência de fluorescência é muitas vezes atribuída à presença de compostos orgânicos (Ravines, 2004). Neste caso, ambos os ambrótipos não aparentam estar envernizados mas, segundo Grant (2000), a ausência de fluorescência não indica necessariamente a ausência de um verniz e refere ainda que a maior parte das resinas sintéticas não apresentam qualquer fluorescência. Daffner e colaboradores (1996) num estudo em que utilizaram radiação UV para identificar deteriorações superficiais em daguerreótipos afirmam que apenas nestes é observada fluorescência ao contrário do que acontece em ambrótipos e negativos de gelatina e associam a fluorescência a áreas localizadas de degradação física e química. No verso de ambos os ambrótipos distinguem-se alguns pontos fluorescentes. Esta evidência pode ser atribuída à presença de colonização microbiana, pois os pontos que sobressaem com uma luz azul intensa estão associados aos aglomerados de fungos filamentosos (colónias microbianas) (cf. 3.2.).

Como já foi referido, dos ambrótipos fazem parte um conjunto de componentes que se encerram num estojo e que desta forma se complementam para originar uma peça única e as espécies em estudo não são exceção. Na tabela 3.2 apresentam-se as peças que fazem parte dos ambrótipos A1 e A2 em imagens obtidas sob luz natural refletida.

Tabela 3.2. Imagens fotográficas sob luz natural refletida dos diferentes componentes que fazem parte dos estojos dos ambrótipos A1 e A2.

Luz natural refletida				
	separador	vidro de proteção	moldura	estojo
A1	frente			
				
	verso			
				
A2	frente			
				
	verso			
				

Para além do sentido estético que estas peças compreendem a sua função principal é a de acondicionamento. O acondicionamento gera um efeito de proteção ao documento fotográfico e por isso a qualidade das peças utilizadas era determinante para garantir a devida conservação da espécie. A utilização de luz natural refletida permite uma observação geral mas suficientemente detalhada para tirar algumas conclusões acerca do estado de conservação das peças. Neste caso em particular, as peças que acompanhavam o ambrótipo A1 aparentam ser de qualidade superior quando comparadas com as peças que faziam parte de A2. O separador metálico do primeiro tem uma estrutura mais trabalhada e esteticamente mais apelativa. A imagem apresentada destaca o bom estado de conservação que ambos apresentam, apontando-se apenas uma pequena área de corrosão

na margem lateral direita do separador de A2. A imagem do verso do separador de A1 evidencia a presença de algum componente que provavelmente terá sido colocado para auxiliar a fixação deste à espécie fotográfica. No que diz respeito aos vidros de proteção, ambos se encontram visivelmente sujos com poeiras e manchas sobre toda a superfície sendo evidente que o vidro de A1 está bastante mais sujo do que o de A2 principalmente na parte central. A sujidade que se vê encontra-se sobretudo na parte do verso dos vidros. A moldura, que tem como função encerrar o conjunto das três peças já descritas, o vidro com a imagem, o separador metálico e o vidro de proteção, que se encontram dispostos nesta mesma ordem, está em boas condições de conservação em ambos os casos e apenas se sublinha uma pequena área de corrosão na margem lateral esquerda na frente da moldura de A2. Por último são apresentados os estojos que aparentam ser de materiais diferentes: enquanto o estojó que acondiciona A1 parece ser de pele, o de A2 tem um aspeto plástico. Segundo a literatura estas peças eram normalmente de couro ou de materiais termoplásticos (Mosciaro, 2009). Ambas as peças apresentam na parte frente riscos, destacamentos e alguma alteração de cor. No que diz respeito ao verso, o primeiro (que complementa A1) tem a base esquerda forrada de tecido e a direita (onde é colocado o espécime) forrada de papel que apresenta manchas e *foxing* por toda a superfície o que indica alguma degradação física e química. Já o que faz parte de A2, tal como o anterior tem a base esquerda forrada a tecido que se apresenta bastante gasto com alterações cromáticas evidentes e algum desgaste físico mas contrariamente ao estojó de A1, a base direita não se encontra forrada por nenhum material e, para além de sujidades e algumas partículas depositadas, não apresenta outros sinais de alteração.

3.1.2. Microscopia ótica

Os ambrótipos A1 e A2 apresentam inúmeras diferenças no que diz respeito à sua morfologia e estado de conservação. É evidente que A2 apresenta um estado de conservação muito mais debilitado que A1. Para estudar mais detalhadamente as amostras, a sua morfologia e respetivas alterações foi utilizado um microscópio estereoscópico e um microscópio ótico de campo escuro. Na tabela 3.3 encontram-se algumas das imagens obtidas através do microscópio estereoscópico que evidenciam deteriorações diversas de ambos os ambrótipos.

Tabela 3.3. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando diferentes deteriorações superficiais presentes em A1 e A2.

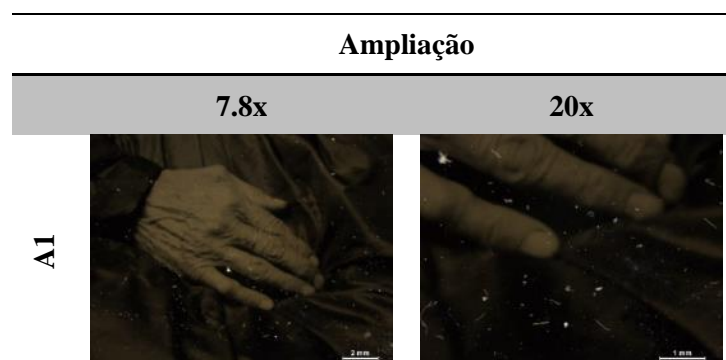
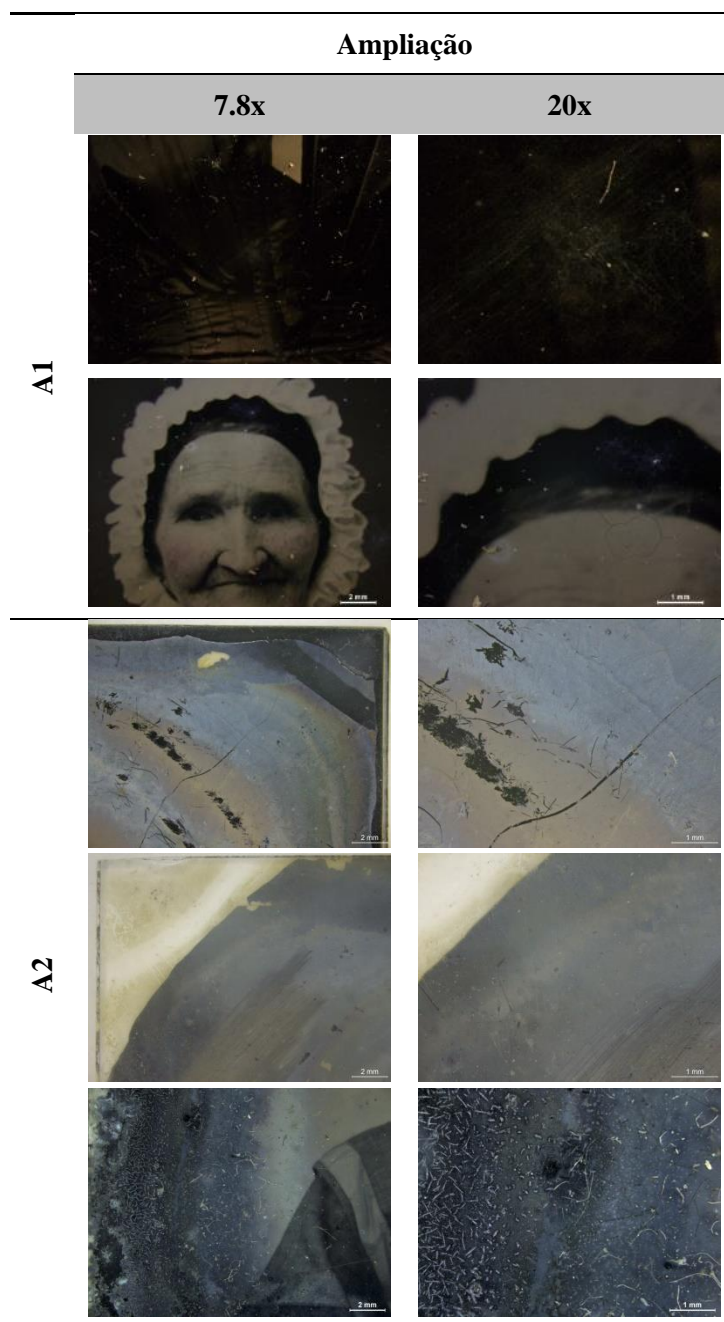


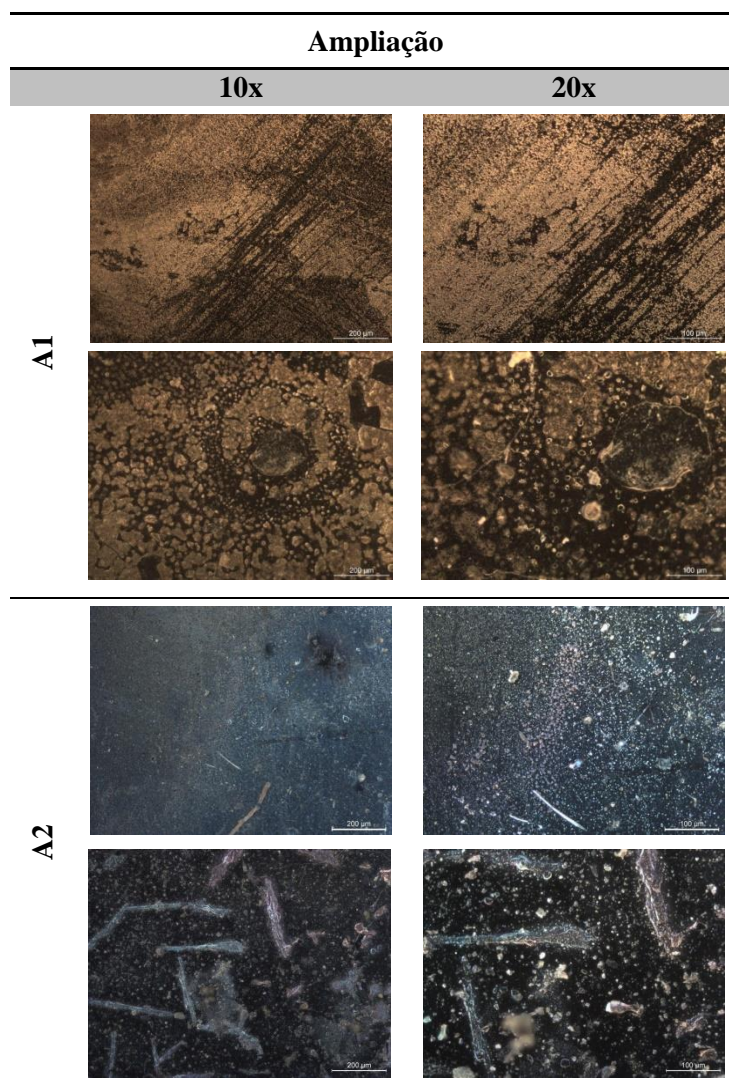
Tabela 3.3. Continuação. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando diferentes deteriorações superficiais presentes em A1 e A2.



Observam-se riscos, destacamento de imagem, reticulação do colódio e presença de fungos em ambas as espécies. Em A2 é evidente a aglomeração de cristais, e verifica-se ainda a presença de sujidade e partículas por toda a sua superfície, ao contrário do que se observa na amostra A1. A presença de espelho de prata é comum a ambas as espécies embora mais pronunciada em A2, encontrando-se disperso por toda a superfície tal como se verificou pela fotografia técnica.

Na tabela 3.4 é possível observar algumas imagens obtidas com um microscópio de campo escuro que evidenciam áreas deterioradas de ambos os ambrótipos.

Tabela 3.4. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro evidenciando áreas deterioradas de A1 e A2.



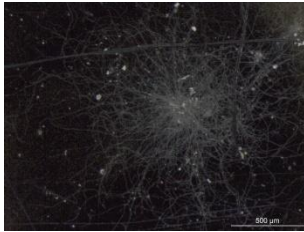


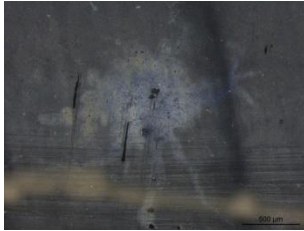
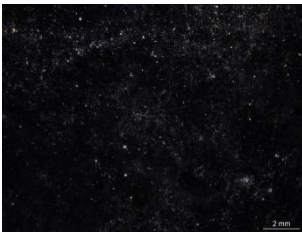
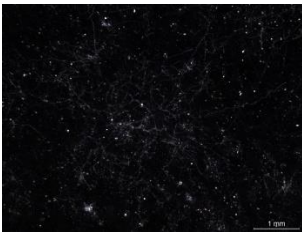
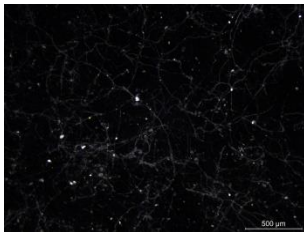
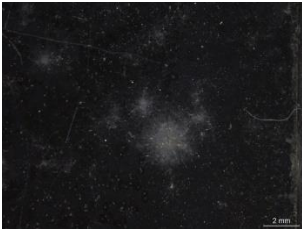
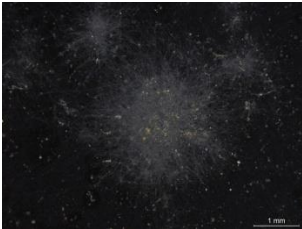
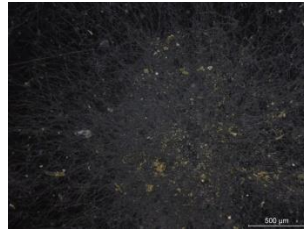


Nas imagens apresentadas de A1, evidenciam-se riscos superficiais e aglomeração de um composto aparentemente resinoso localizado principalmente nas margens da espécie e que provocou alterações cromáticas e morfológicas. A composição deste composto foi estudada com recurso ao MEV-EDS (cf. 3.1.3.) e ao μ -FT-IR (cf. 3.1.4.). À semelhança de A1, as imagens apresentadas para A2 permitem verificar diferentes deteriorações na sua superfície, tais como alterações cromáticas e riscos, entre outros. Verifica-se a presença de cristais na parte lateral esquerda do ambrótipo, área onde se encontra fixo o separador metálico.

À semelhança do que se observa em A1, é possível verificar a presença de fungos em A2 sendo neste último a contaminação microbiológica bastante mais pronunciada e mais acentuada no verso. Na tabela 3.5 mostram-se imagens de microscópio estereoscópico da frente e verso de ambos os ambrótipos onde é também possível observar a presença de fungos. As diferenças relativas a este

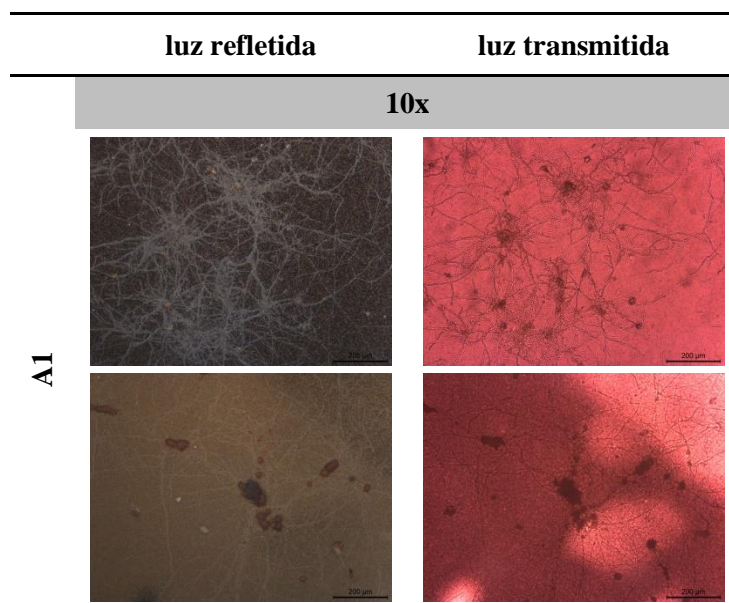
tipo de contaminação entre a amostra A1 e A2 baseiam-se na densidade de fungos (na amostra A2 é visivelmente superior) e na distribuição espacial dos mesmos.

Tabela 3.5. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando a presença de contaminação microbiológica nos ambrótipos A1 e A2.

		Ampliação		
		7.8x	20x	63x
		frente		
A1				
A2				
		verso		
A1				
A2				

Em A1, a colonização fúngica encontra-se maioritariamente na frente, dispersa sobre toda a superfície enquanto em A2 o verso, aparentemente, encontra-se mais colonizado. A utilização do microscópio de campo escuro em modo de luz transmitida é bastante útil pois permite diferenciar fungos filamentosos de fibras e outras partículas que se encontram depositadas na superfície dos ambrótipos. Neste caso, como o vidro de suporte de A1 é um vidro *ruby*, permite a passagem de luz, possibilitando a aquisição de imagens em modo de luz transmitida ao contrário do que acontece no A2 que apresenta o verso pintado com uma substância opaca, impossibilitando a utilização de luz transmitida para este efeito. Na tabela 3.6 são apresentadas algumas imagens representativas da colonização microbiana na frente de A1.

Tabela 3.6. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro evidenciando a presença de fungos na frente do ambrótipo A1.



3.1.3. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energias (MEV-EDS)

A utilização desta técnica, sobretudo em modo de pressão variável, é fundamental em estudos de caracterização pois as análises são não destrutivas e permitem documentar a morfologia e a topografia das amostras e a análise por EDS possibilita a caracterização química elemental.

Foram realizadas análises MEV a ambos os ambrótipos com o propósito de caracterizar a morfologia das amostras e as patologias que estas apresentam. Através das imagens de MEV foi possível observar detalhadamente as partículas formadoras de imagem, estimar de modo aproximado a sua dimensão e avaliar a sua distribuição espacial nas áreas de altas e baixas luzes e na interface entre ambas (tabela 3.7).

Tabela 3.7. Imagens de MEV representativas das diferentes densidades das partículas formadoras de imagem nas áreas de altas e baixas luzes e interface de ambas as amostras A1 e A2.

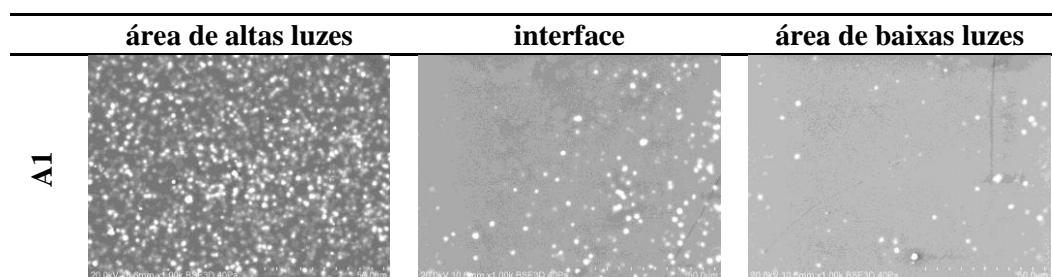
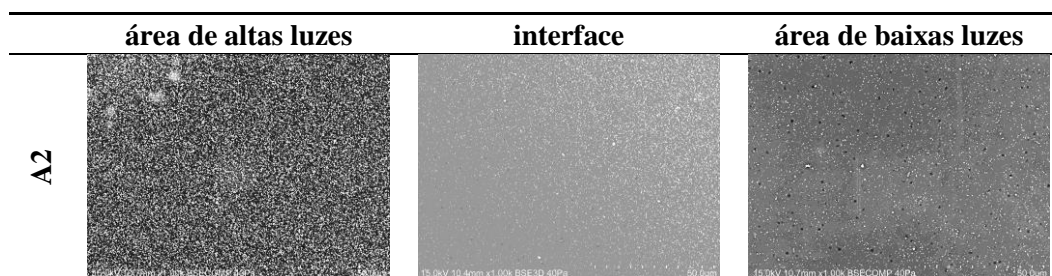


Tabela 3.7. Continuação. Imagens de MEV representativas das diferentes densidades das partículas formadoras de imagem nas áreas de altas e baixas luzes e interface de ambas as amostras A1 e A2.



A observação das imagens da tabela 3.7 evidencia a existência de diferenças na dimensão das partículas formadoras de imagem entre diferentes áreas. A avaliação do tamanho das partículas para as diferentes áreas dentro da mesma espécie mostrou que existem variações e ainda se verifica que as partículas têm dimensão diferente nos dois ambrótipos. As áreas de altas luzes da amostra A1 têm partículas que medem aproximadamente $0,63\ \mu\text{m}$ enquanto na amostra A2 apresentam cerca de $0,34\ \mu\text{m}$. Nas áreas de baixas luzes da amostra A1 as partículas apresentam diâmetros com cerca de $1,60\ \mu\text{m}$ e na amostra A2 de $0,28\ \mu\text{m}$. Conclui-se que as partículas têm dimensões superiores na amostra A1 relativamente à A2, o que sugere também uma maior densidade de partículas em A2 do que em A1 para regiões equivalentes. Como seria de esperar, a região das altas luzes apresenta uma maior densidade de partículas formadoras de imagem do que a região das baixas luzes nos dois ambrótipos. As imagens da interface evidenciam claramente este facto. Relativamente ao processo fotográfico anterior à ambrotipia, ou seja, daguerreotipia (da qual resultavam daguerreótipos) as dimensões das partículas formadoras de imagem aparentam ser uma das principais distinções entre processos. Barger e colaboradores (1991), num estudo elaborado sobre daguerreótipos, elucidam para o facto de existir uma diferença entre as dimensões das partículas nas diferentes áreas, sendo que as partículas das áreas de altas luzes aparentam ter uma dimensão superior em comparação às áreas de baixas luzes. Esta diferença é justificada pela utilização de mercúrio na etapa de revelação da imagem. No caso dos ambrótipos o procedimento é diferente e a utilização de mercúrio era muito pouco comum, mas quando aplicada tinha como função aclarar imagens e não era utilizado para a revelação. A análise elementar pontual mostrou que, de facto, a prata (Ag) principal é o único constituinte das partículas formadoras de imagem (A1 e A2) (Fig. 3.1).

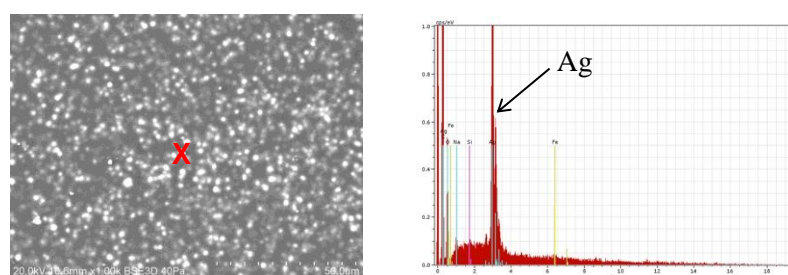
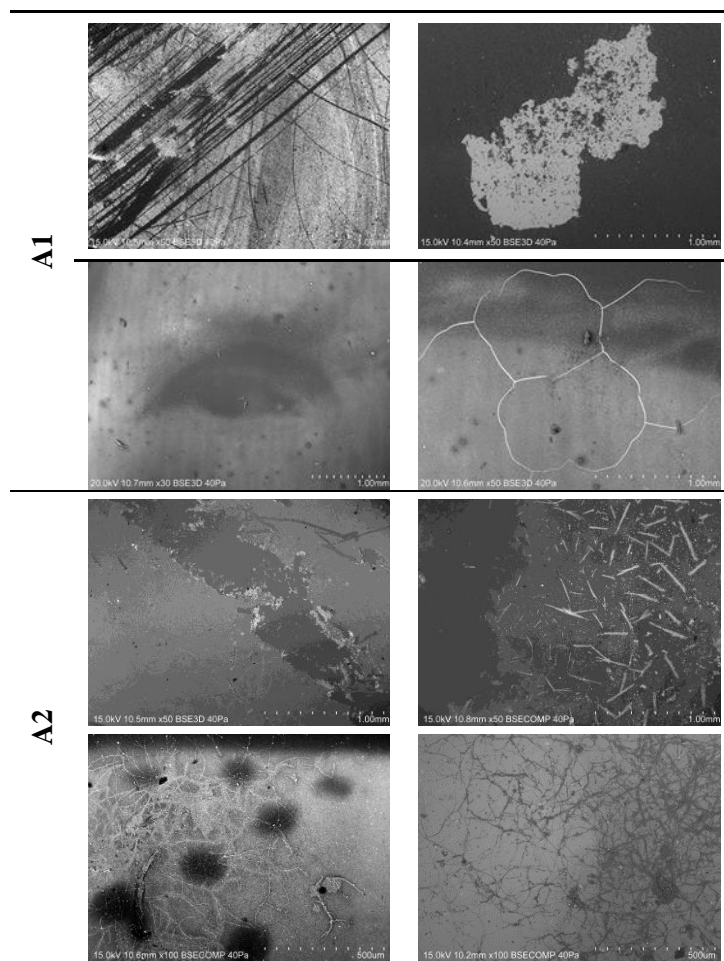


Figura 3.1. Imagem de MEV de uma área de altas luzes da amostra A1 e respetiva análise pontual EDS.

O estudo morfológico por MEV permitiu registar vários aspetos das patologias observadas nas duas espécies fotográficas em estudo. Na tabela 3.8 apresentam-se algumas imagens representativas de degradação superficial das amostras A1 e A2 onde é possível distinguir as diferentes tipologias encontradas. Ambas as amostras apresentam riscos superficiais, deposição de partículas, reticulações de colódio e destacamentos de imagem. No caso particular de A2 verificam-se também depósitos de cristais e apresentam-se alguns exemplos da contaminação microbiológica presente na superfície espécie mas sublinha-se que este facto é comum a ambos os ambrótipos.

Tabela 3.8. Imagens de MEV de degradações superficiais das amostras A1 e A2.



O estudo realizado por MEV-EDS foi bastante mais extenso do que o aqui apresentado, mas para não tornar o documento demasiado longo, indicam-se apenas algumas análises representativas do trabalho efetuado (figuras 3.2 e 3.9).

✓ A1



Figura 3.2. Áreas seleccionadas para análise por MEV-EDS na amostra A1.

O ponto 1 foi realizado numa área degradada que apresenta alterações cromáticas e a presença de riscos. Para além de complementar a informação morfológica destas degradações já visíveis à vista desarmada, as imagens de MEV demonstraram reticulações da resina que se encontra sob as margens da espécie e depósitos de partículas variadas. Mapas elementares e análises pontuais realizados nesta área revelaram a presença de iodo, enxofre, potássio e prata. A presença de iodo permite concluir acerca do composto fotossensível que foi utilizado aquando o processo de produção. Segundo Towler (1864) e Carreti e colaboradores (2009), um dos compostos utilizados para a formação dos sais de prata foram os iodetos e/ou brometos de diferentes metais. A presença de iodo aponta assim para uma lavagem imperfeita do documento fotográfico após sensibilização no qual não foram eliminados na totalidade os sais de prata que não foram expostos. A detecção de enxofre pode estar relacionada com a presença de espelho de prata, deterioração que resulta da oxidação da prata e posterior reação desta com compostos residuais presentes na atmosfera envolvente. Como já foi referido, esta deterioração manifesta-se pelo aparecimento de manchas de cor azulada que lhe atribuem uma aparência metálica fazendo lembrar um espelho (Di Pietro, 2002; Pavão, 2010). A utilização de tiosulfato de sódio no processo de produção poderá também ser apontada como uma das principais responsáveis pela presença de enxofre na superfície do ambrótipo que ao reagir com a prata pode formar sulfureto de prata (Ag_2S), composto que também se pode formar pela interação entre o sulfureto de hidrogénio (H_2S) presente na atmosfera e a prata (Di Pietro, 2002). Na figura 3.3 é possível observar a associação entre o enxofre e a prata e ainda do primeiro com o potássio. A presença deste último pode ser devida a utilização de iodeto de potássio ou nitrato de potássio (solução utilizada para aumentar o brilho da imagem (James, 2007)). Nas figuras 3.3 e 3.4 é possível observar, respetivamente, um mapa de distribuição elementar e uma análise pontual realizada no ponto 1.

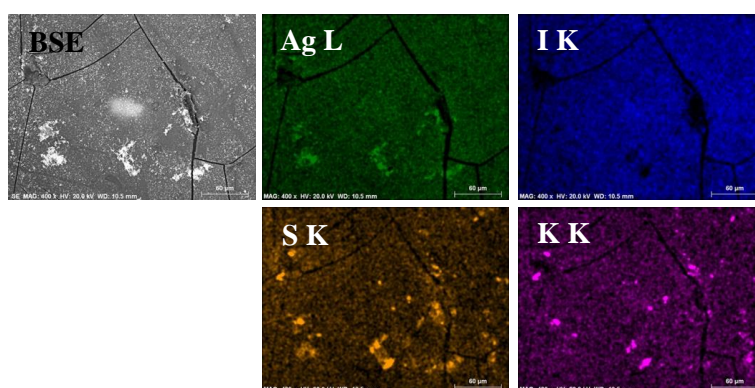


Figura 3.3. Mapa de distribuição elementar EDS no ponto 1.

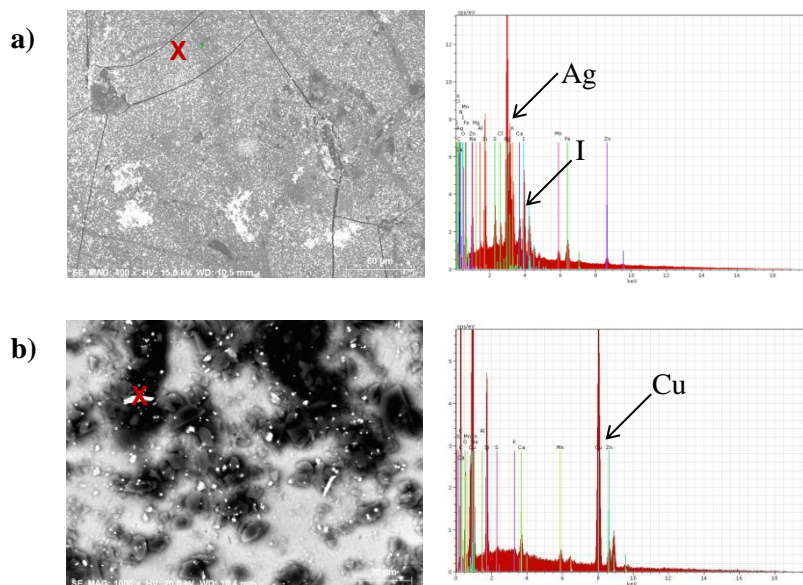


Figura 3.4. Análise pontual elementar por EDS do ponto 1: a) verifica-se a presença de Ag e I na superfície da espécie; b) verifica-se a presença de Cu .

É ainda de referir a presença de partículas de cobre cuja origem deve ser atribuída à presença do separador metálico, cuja a composição elementar é uma liga de cobre e zinco (Figura V.1. do anexo V) (note-se que o ponto 1 se encontra a assinalar uma área no canto superior esquerdo onde se encontra fixo este separador).

As imagens realizadas ao ponto 2 revelam uma área que apresenta destacamento de imagem, onde é possível distinguir duas áreas, uma com ausência e outra com presença da camada de colódio. O destacamento desta camada é uma degradação muito comum em ambrótipos e pode ser causada pela penetração de cristais do vidro, ou seja, quando este começa a apresentar deteriorações, forma cristais que se vão acumulando na superfície e “empurrando” a camada, provocando destacamentos (Clark, 1998) ou ainda pela presença de fungos filamentosos como foi referido anteriormente. Neste caso específico a degradação pode ter sido causada durante a remoção do separador metálico aquando a abertura do ambrótipo.

Relativamente à figura 3.5a que diz respeito ao ponto 2, a área analisada apresenta destacamento da imagem e por esta razão foi possível analisar o suporte (sem qualquer revestimento sobre este) e a solução fotográfica.

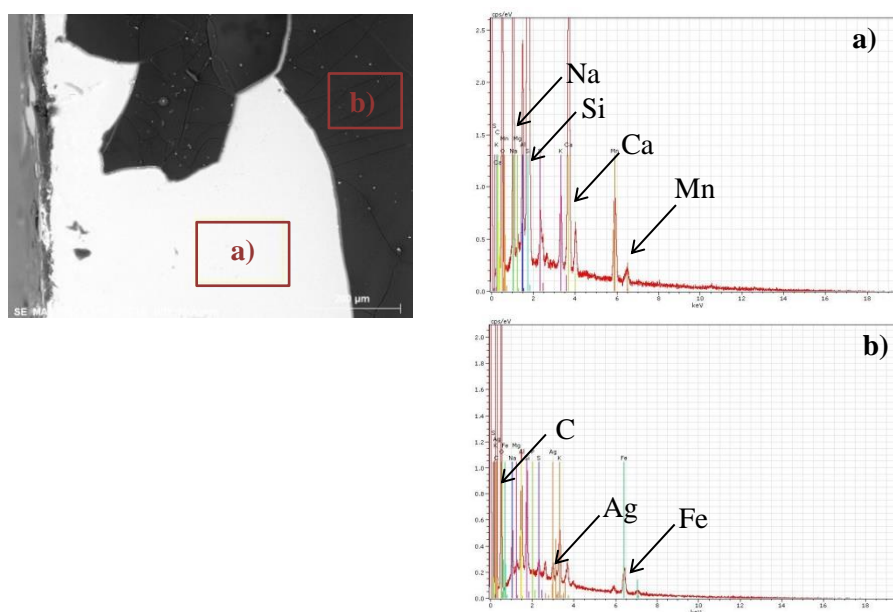


Figura 3.5. Imagem de MEV e respectivas análises composicionais por EDS do ponto 2: **a)** área sem solução fotográfica; **b)** área de solução fotográfica.

A análise ao vidro de suporte (figura 3.5a) revela a presença dos elementos silício, sódio e cálcio ou seja, a composição base de um vidro de silicato soda-cálcico. Os compostos básicos são o dióxido de silício (SiO_2), o carbonato de sódio (Na_2CO_3) ou cloreto de potássio (compostos usados como fundentes com o objetivo de baixar o ponto de fusão da sílica) e cal (óxido de cálcio, CaO) para restabelecer insolubilidade (Whitman, 2007). O vidro é referido principalmente como um produto obtido por fusão de sílica e um composto alcalino (como o sódio), juntamente com a cal, reduzindo assim a sua solubilidade em água. Esta combinação de soda-cal e origina o vidro comumente designado de vidro de sílica ou vidro soda-cal e corresponde a uma composição eutética da mistura ternária (aproximadamente 73% de SiO_2 , 22% Na_2O e 5% CaO) (Gratuze & Janssens, 2004). Para além destes elementos sublinha-se a presença de manganês (Mn) e ainda potássio. A presença de manganês está associada a vidros *ruby*, pois fazia parte da constituição de um corante utilizado para atribuir cor ao vidro (Duncan, 2009). Whitman (2010) refere que os metais mais utilizados para colorir os vidros de vermelho eram o ouro e o cobre e que o manganês originava vidros *ruby* ametista. Segundo Langhamer (2003), o manganês proporcionava uma cor roxa avermelhada mas quando utilizadas elevadas concentrações de óxido de manganês sobre condições de oxidação, este atribuía ao vidro uma cor praticamente preta. A utilização de vidros *ruby* eliminava a necessidade de aplicação de uma superfície ou composto de cor escura no verso da espécie. A solução fotográfica (Fig. 3.5.b) é constituída maioritariamente por carbono, apresentando alguns elementos vestigiais como o alumínio, silício, potássio e o ferro. Para além do ferro, todos os elementos fazem parte da constituição do vidro de suporte. O composto orgânico que aparenta estar presente e do qual faz parte o carbono verificado na análise poderá ser um verniz ou uma resina. O ponto 3 foi selecionado pois evidenciava a presença de contaminação microbiológica.

O recurso ao MEV permitiu observar estruturas microbiológicas que indicam a presença de contaminação. Neste caso o recurso a análises EDS não permite confirmar se se trata de microrganismos pois as análises são influenciadas pela presença do composto orgânico (matriz) que acaba por ser um contaminante natural. Na figura 3.6 apresentam-se algumas imagens representativas da presença de contaminação microbiológica na superfície da espécie fotográfica.

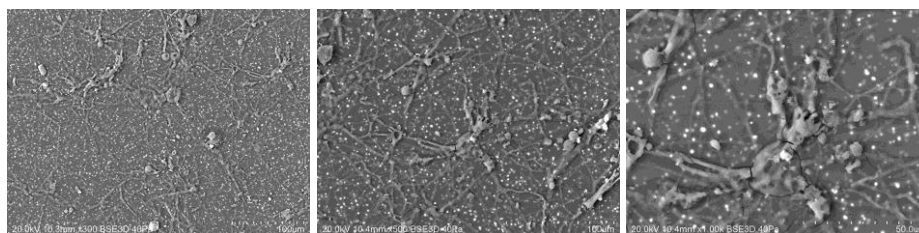


Figura 3.6. Imagens MEV que apresentam a presença de microrganismos na superfície da amostra A1 com evidência de hifas e estruturas reprodutoras (esporos).

Observações semelhantes às ilustradas na Fig 3.6 foram feitas por grande parte da superfície da amostra, com maior expressão em áreas de baixas luzes. A maior aglomeração de presença microbiana verifica-se na frente do ambrótipo A1, constituída essencialmente, por fungos filamentosos. Sterflinger (2010), em estudos sobre a ação de microrganismos em espécies fotográficas, referencia a ação degradativa destes, nomeadamente, danos físicos devido à formação de colónias, libertação de pigmentos e penetração das hifas no material às quais estão aderentes, o que poderá acelerar o processo de reticulação de colódio e do verniz. Grande parte dos microrganismos aparentam estar entre a camada de colódio e verniz, pois a sua remoção direta não foi possível quando se fez a amostragem microbiológica. No verso, parecem estar aderentes ao vidro, compactados entre o colódio e este.

Na figura 3.7 apresentam-se algumas imagens do verso de A1 onde se pode observar a presença de microrganismos. Tendo em conta que o verso do vidro de suporte da espécie não se encontra pintado nem envernizado, foram realizadas análises EDS aos agentes microbianos que se encontravam colonizados nesta superfície e à própria superfície para comparação.

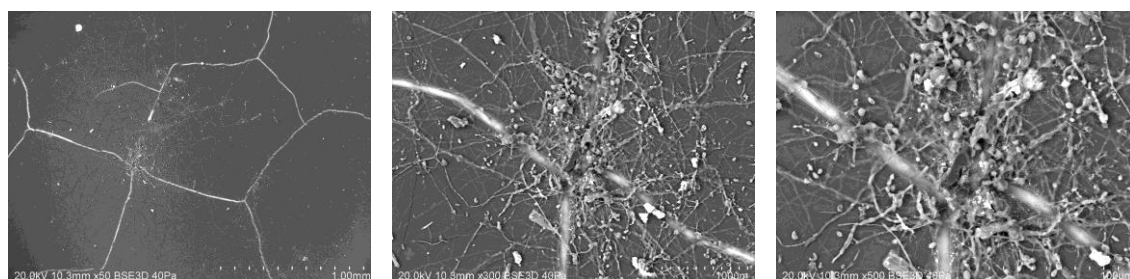


Figura 3.7. Imagens MEV que mostram a presença de microrganismos no verso da amostra A1 com evidência de hifas e estruturas reprodutoras (esporos).

A Figura 3.8 *a* e *b* mostra essa mesma comparação e verifica-se que na primeira análise (Fig. 3.8*a*) o espectro é dominado pelo carbono enquanto na análise à superfície não colonizada (Fig. 3.8*b*), estão presentes os elementos químicos que fazem parte da composição do vidro (o silício, o cálcio, o potássio) e o manganês que faz parte do corante usado para dar cor ao vidro, ou seja, o carbono não é o elemento dominante do espectro. Estes resultados são indicativos da presença de microrganismos na superfície do verso da espécie fotográfica.

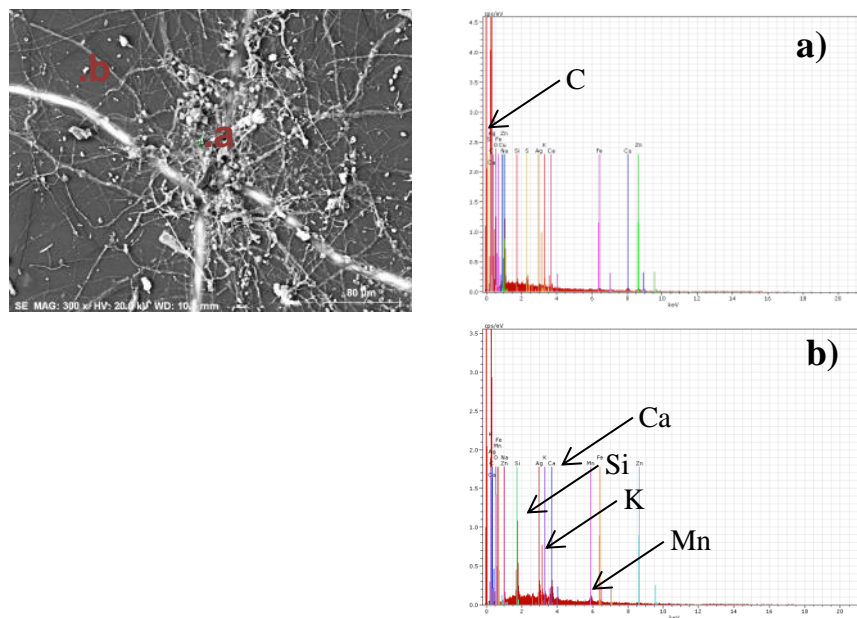


Figura 3.8. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS (do ponto 3) de uma área colonizada por fungos filamentosos no verso da amostra A1. **a)** presença de colonização microbiana; **b)** área sem colonização microbiana.

✓ A2



Figura 3.9. Áreas selecionadas para análise por MEV-EDS na amostra A2.

No que diz respeito ao ponto 1 (figura 3.9), foram realizadas análises EDS que revelaram a presença de degradações distintas. Foram detetados elementos como a prata, que como já foi referido anteriormente, faz parte da constituição elementar da imagem, o zinco, cobre e ferro, sendo que os dois primeiros resultam de contaminação derivada do separador metálico que se encontra em

contacto com a área em questão (margem lateral direita) e a presença de ferro poderá provavelmente dever-se à formação de produtos de corrosão. Na figura 3.10 está representado um mapa de distribuição elementar (EDS) onde se pode verificar a presença e associação dos elementos enxofre e prata, o que sugere a presença de sulfureto de prata. Tal como já foi referido, a formação de sulfureto de prata pode estar relacionada com a reação da prata metálica (consequência da oxidação de átomos de prata - processo de degradação “espelho de prata”) com o enxofre. Foi também realizada uma análise composicional EDS (Fig. 3.11.) onde se detetaram os elementos já referidos, bem como cloro e enxofre. O cloro à partida não está relacionado com a substância fotossensível que foi utilizada durante a produção do ambrótipo pois foi detetado como partículas de dimensões consideráveis ao invés de disperso sobre a superfície juntamente com a prata. Processos de degradação apontam-se como os principais responsáveis pela presença de cloro. Este elemento poderia também ser proveniente da utilização de cloreto de mercúrio, que alguns autores referem que tinha como função tornar a imagem mais clara (Duncan, 2009; Remple, 1976), mas neste caso a ausência de mercúrio na análise EDS afasta essa hipótese.

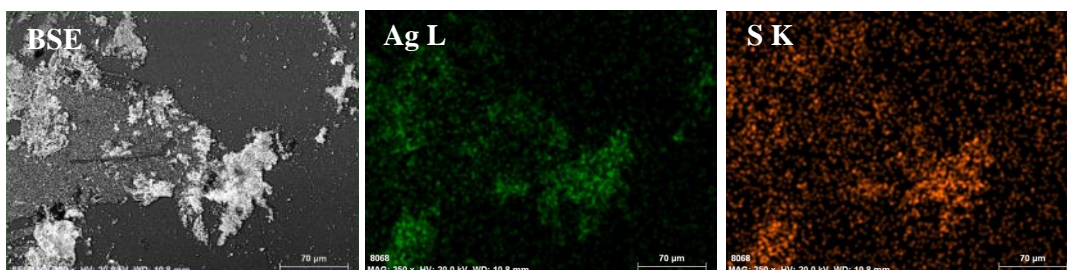


Figura 3.10. Mapa de distribuição elementar EDS do ponto 1.

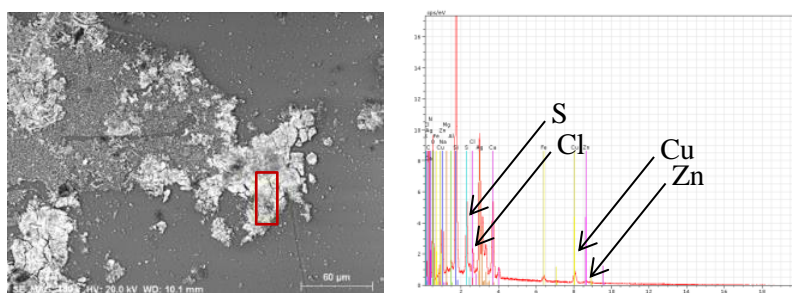


Figura 3.11. Imagem de MEV e respetiva análise composicional EDS de uma área do ponto 1.

O ponto 2 (Fig. 3.9) localiza-se na margem lateral esquerda da espécie fotográfica, que se encontra visivelmente degradada, apresentando destacamento da camada de colódio, riscos e deposição de partículas. As imagens de MEV da figura 3.12 elucidam para as diferentes patologias presentes. Nesta área em particular verifica-se a presença de cristais de estrutura fina e alongada (Fig. 3.12 *a, b*) e de várias partículas com estrutura pouco definida e de dimensões muito superiores às partículas formadoras de imagem (Fig. 3.12*c*).

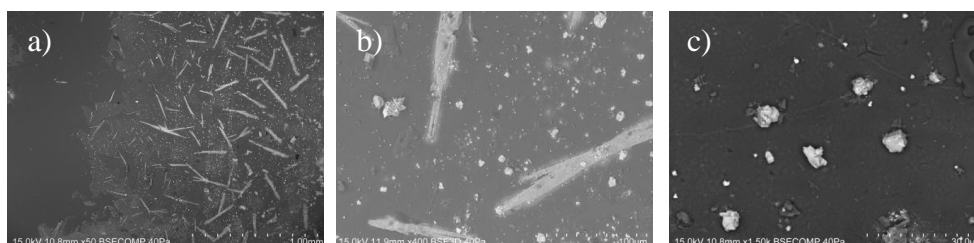


Figura 3.12. Imagens de MEV relativas ao ponto 2; a) presença de cristais, b) ampliação de a, c) partículas de cloro.

Os cristais apresentam uma composição elementar um pouco difícil de determinar pois as análises encontram-se influenciadas pela presença de vários elementos provenientes de contaminações variadas. Uma das hipóteses da proveniência dos cristais seria o separador metálico. Como estes estão depositados numa área que estava em contacto com o separador, era provável que surgisse acumulação de produtos de corrosão. Na figura 3.13 e 3.14 apresentam-se um mapa de distribuição elementar e uma análise elementar pontual (EDS) a um destes cristais, respetivamente.

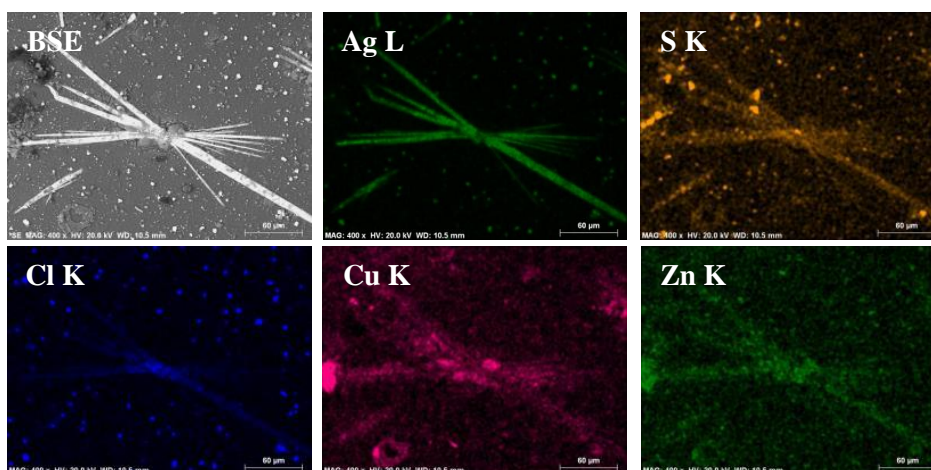


Figura 3.13. Mapa de distribuição elementar EDS do ponto 2.

O mapa de distribuição elementar permite verificar que o cristal analisado tem uma composição elementar enriquecida em prata. A partir das imagens não parece haver nenhuma associação de um outro elemento à prata. Aponta-se a presença de algumas partículas de enxofre, bem como de cloro à volta do cristal. Cobre e zinco estão também presentes e são resultado do contacto da espécie com o separador metálico. A análise apresentada na figura 3.14.1, confirma a presença dos elementos, prata, enxofre e cloro. Sublinha-se também a presença de cobre e zinco, mas encontram-se em quantidades inferiores aos elementos anteriores (Fig. 3.14.2). O resultado das análises realizadas permitem concluir acerca da composição química dos cristais que parece ser essencialmente prata, o que afasta o separador metálico como responsável pela proveniência dos mesmos. Segundo Petherbridge (1987) existem dois tipos de estruturas de partículas de prata, arredondada e filamentosa, sendo que a última tem tendência para recrystalizar na primeira a menos que tenham sido utilizados compostos como sulfuretos e/ou iodetos ou agentes de fixação (p.e. tiosulfato de sódio) que retardam este processo. Petherbridge (1987) afirma ainda que o processo de recrystalização da estrutura filamentosa para a arredondada é uma das principais causas da perda de

densidade e do amarelecimento da imagem, patologias características de fotografias antigas. As partículas cúbicas são compostas por cloro mas também contêm prata. Estes dados são indicativos da presença de partículas de cloreto de prata (AgCl) sobre a superfície. Segundo Duncan (2009) quando existem deteriorações resultantes de oxidação (como a presença de sulfureto de prata, por exemplo) os óxidos de prata resultantes, na presença de água (atmosfera húmidas) proporcionam um potencial eletrostático que promove a penetração de iões corrosivos de sulfureto e de cloreto que atacam a estrutura do ambrótipo prejudicando desta forma a integridade da imagem.

Os elementos zinco e cobre encontram-se associados o que leva a apontar o separador metálico como principal responsável pela origem destes elementos na superfície do ambrótipo.

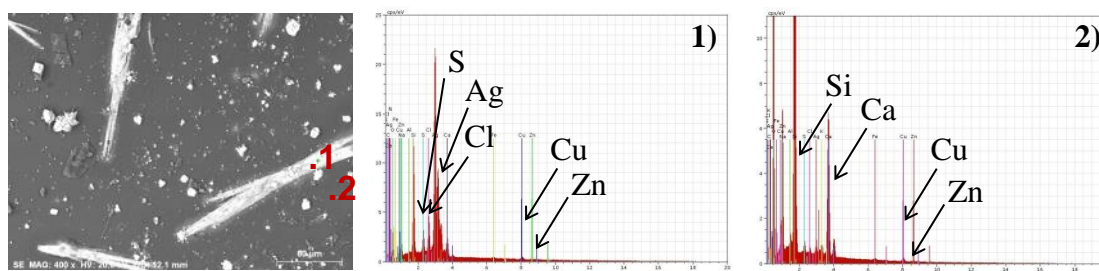


Figura 3.14. Imagem de MEV relativa ao ponto 2 e respetivas análises pontuais elementares por EDS: **1)** análise pontual EDS a um cristal evidenciando a presença de Ag; **2)** análise pontual EDS a uma área de solução fotográfica.

Uma técnica muito utilizada nos ambrótipos foi o retoque fotográfico. Este era um procedimento aplicado após o processamento da imagem fotográfica e que tinha como principal objetivo fazer sobressair/enaltecer certos detalhes e pormenores que compunham a imagem. Este ambrótipo é um exemplar da aplicação de retoque. Para além das joias, o retoque também era muito utilizado para fazer sobressair as faces rosadas, lábios e a cor dos olhos. As análises realizadas sobre o colar dourado (ponto 3, assinalado na figura 3.9) revelaram partículas de ouro sobre a superfície do ambrótipo (Fig. 3.15).

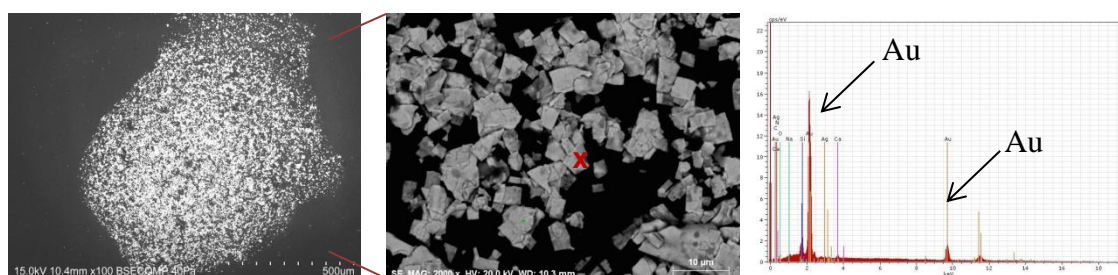


Figura 3.15. Imagens de MEV das partículas de ouro e respetiva análise pontual elementar por EDS.

A presença de material biológico foi verificada por toda a superfície do ambrótipo, com maior expressão nas áreas de baixas luzes relativamente às áreas de altas luzes, tal como acontece na no ambrótipo A1. Zyska e colaboradores (1988) a partir de um estudo elaborado a 50 negativos em suporte de vidro afirmam que colónias de diferentes espécies são observadas como círculos concêntricos sob o verniz e na camada de colódio e ainda como ramificações fortemente aderentes ao

vidro, ou seja, as estruturas microbianas observam-se em três materiais distintos. No caso de A2 esta evidência é constatada. As imagens apresentadas permitem distinguir os diferentes planos em que se observam as estruturas microbianas sugerindo que se existem colônias mais superficiais e outras em camadas inferiores das quais se acaba por perder informação visual. Na figura 3.16 apresentam-se algumas imagens (relativas a A2) que sugerem a presença de contaminação microbiológica.

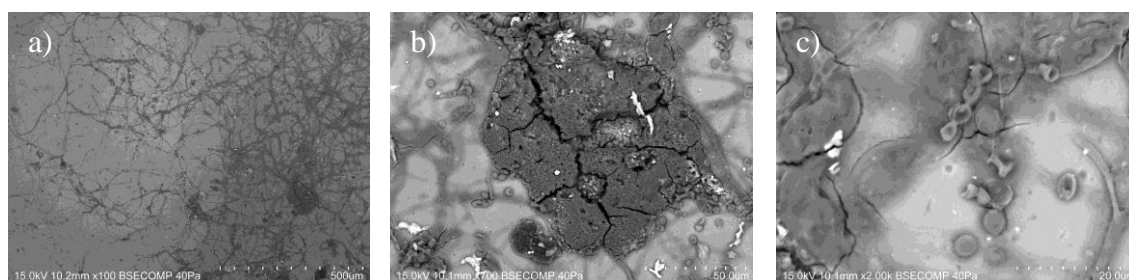


Figura 3.16. Imagens de MEV sugestivas da presença de microrganismos: **a)** colonização superficial na camada de colódio; **b)** círculo concêntrico sob a camada de colódio e ramificações que penetraram para uma camada inferior; **c)** presença de estruturas reprodutoras (esporos).

As análises EDS (Fig. 3.17) realizadas no ponto 4 confirmam a presença de material orgânico, mas tal como em A1, para A2 não foi possível confirmar a presença de microrganismos com recurso ao EDS pois a matriz em análise tem uma componente orgânica que se torna num contaminante natural (neste caso). A presença de carbono domina o espectro mas também se verifica a presença de azoto. Estão ainda presentes o silício, cálcio e potássio (que fazem parte da composição do vidro). Para verificar a presença de microrganismos é necessário complementar estas análises com a espectroscopia de infravermelho.

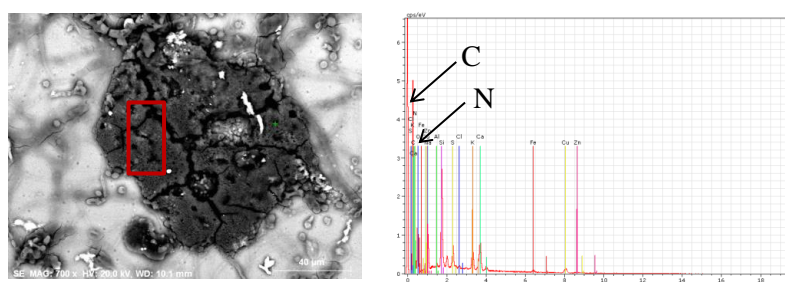


Figura 3.17. Imagem de MEV de aparente contaminação microbiológica e respetiva análise composicional (EDS).

Foram realizadas algumas imagens MEV ao verso do ambrótipo, que se encontrava visivelmente colonizado por microrganismos. Na figura 3.18 apresenta-se a superfície do verso não colonizada ao contrário do que se observa na Fig. 3.19 onde se verifica a presença de fungos filamentosos. Neste caso as análises EDS também não poderiam confirmar a presença de colonização microbiológica pois, contrariamente a A1 o suporte de A2 não é um vidro *ruby* e por isso, o verso do vidro foi coberto por um material de cor negra para que o negativo figurasse positivo. Assim as análises EDS seriam dominadas pela presença de carbono, não sendo desta forma elucidativas.

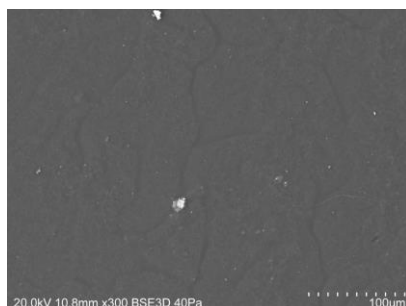


Figura 3.18. Imagem de MEV da superfície não colonizada do verso da amostra A2.

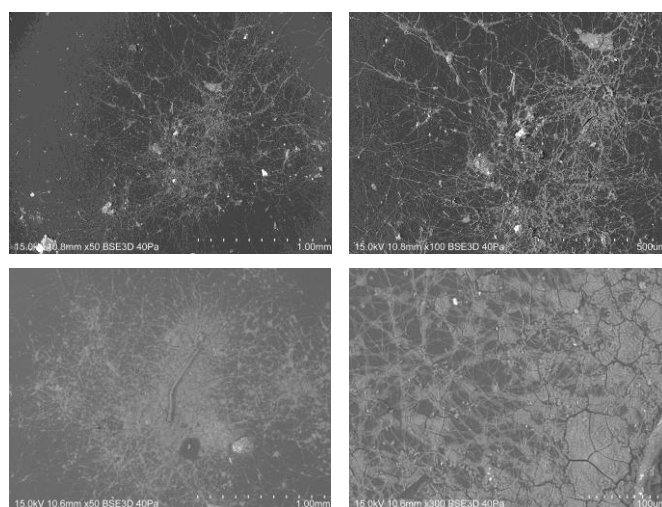


Figura 3.19. Imagens de MEV onde se verifica a presença de colonização microbológica no verso da amostra A2.

3.1.4. Micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μ -FT-IR)

A micro-espectroscopia de infravermelho é uma técnica versátil e de fácil execução com uma rapidez de análise e sensibilidade muito elevadas que veio melhorar o potencial da espectroscopia vibracional no campo do diagnóstico e conservação de património cultural (Francesco de La Russa *et al.*, 2009).

Os dois ambrótipos A1 e A2 foram estudados por μ -FT-IR em modo ATR tendo sido analisadas áreas sem degradações superficiais para identificar a composição química da camada de colódio e caso existisse envernizamento, os materiais utilizados para o efeito. Foram também analisadas áreas que demonstravam degradações superficiais bem como a presença de contaminação microbológica. No anexo II são apresentados os espectros obtidos na base de dados IRUG e que foram usados na interpretação dos resultados.

Foram realizadas análises ao ambrótipo A1 em áreas selecionadas que se consideram representativas. Na apresentação dos resultados, cada espectro é acompanhado pela área onde a análise foi realizada.

A figura 3.20 corresponde a uma área da superfície aparentemente não degradada da qual se obteve um espectro característico do nitrato de celulose, semelhante ao descrito na bibliografia (Walsh, 1995; López-López *et al*, 2010; Quye *et al*, 2011). As três bandas de maior intensidade (1642, 1276 e 848 cm^{-1}) são devidas ao estiramento antissimétrico e simétrico de NO_2 e ao estiramento da ligação O- NO_2 , respetivamente. O grupo de bandas de menor intensidade no intervalo entre 1200 e 950 cm^{-1} é devido a diferentes vibrações do grupo CO (Kovalenko *et al*, 1994). Quye e colaboradores (2011) sublinham ainda a presença de uma banda aos 1070 cm^{-1} que resulta do estiramento da ligação C-O em $\text{C}_1\text{-O-C}_4$. Shashoua e colaboradores (1992) consideram também uma banda de absorção aos 1720 cm^{-1} , a qual atribuem aos grupos carbonilo, mas que Quye (2011) não considera como sendo uma banda característica do nitrato de celulose. No espectro obtido em A1, em vez de uma banda bem definida observa-se um pequeno *shoulder* (*ombro*, do inglês) e de intensidade bastante reduzida aos 1718 cm^{-1} . Esta banda pertence à região dos grupos carbonilos mas neste caso não é possível dizer a que se deve.

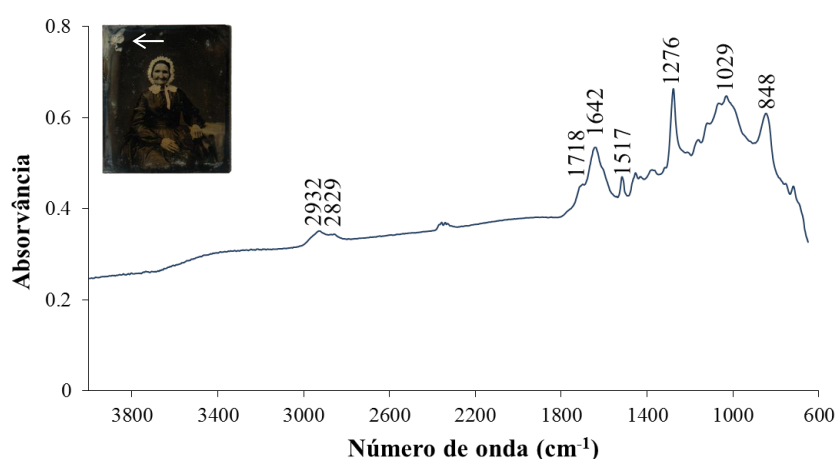


Figura 3.20. Espectro de μ -FT-IR de uma área que visivelmente não apresenta degradação superficial da amostra A1 e que evidencia a presença de nitrato de celulose.

Na tabela 3.9 são apresentados os valores de número de onda das diferentes bandas do espectro de infravermelho da área em análise e a atribuição das vibrações correspondentes, feita de acordo com a bibliografia.

Tabela 3.9. Atribuição das vibrações presentes no nitrato de celulose às bandas observadas no espectro de infravermelho obtido na área em análise (Shashoua, *et al*. 1992; Kovalenko *et al*. 1992; Quye *et al*. 2011; Mitchell *et al*. 2013; Berthumeyrie *et al*. 2014).

Número de onda (cm^{-1})	Designação
3300-3500	estiramento v (O-H)
3300-3200	estiramento v (N-H)

Tabela 3.9. Continuação. Atribuição das vibrações presentes no nitrato de celulose às bandas observadas no espectro de infravermelho obtido na área em análise (Shashoua, *et al.* 1992; Kovalenko *et al.* 1992; Quye *et al.* 2011; Mitchell *et al.* 2013; Berthumeyrie *et al.* 2014).

Número de onda (cm^{-1})	Designação
2932	estiramento simétrico ν_{sim} (C-H)
1680	estiramento assimétrico ν_{assim} NO_2
1415	deformação CH_2
1276	estiramento simétrico ν_{sim} NO_2
1029	estiramento ν C-O ($\text{C}_1\text{-O-C}_4$)
848	estiramento simétrico ν_{sim} (O- NO_2)
725	deformação δ NO_2
749	flexão γ (N-O)

Na figura 3.21 são apresentados os espectros obtidos numa área de baixas e de altas luzes, ponto *a* e *b*, respectivamente. A nível molecular, não se verificam diferenças entre ambos os espectros (apresentam exatamente as mesmas bandas) sendo que na área de baixas luzes o espectro encontra-se mais bem definido mas as bandas apresentam intensidade inferior relativamente à área de altas luzes.

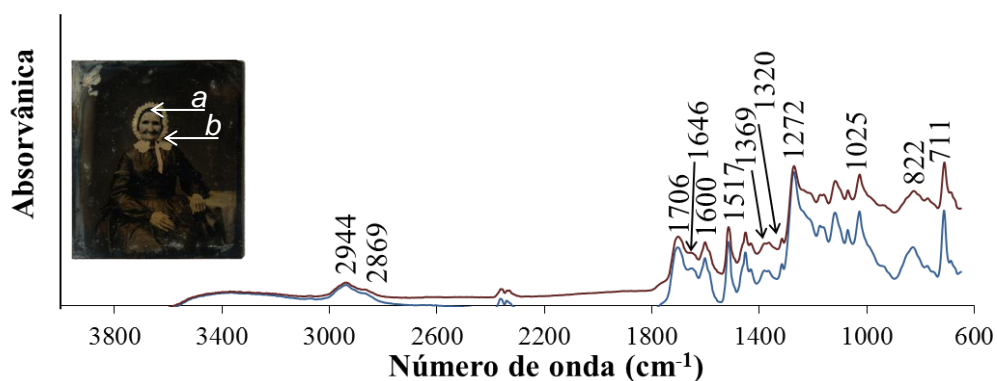


Figura 3.21. Espectro de μ -FT-IR de uma área de baixas luzes (azul) e de uma área de altas luzes (vermelho), pontos *a* e *b*, respectivamente.

Uma das bandas características do NC (1646 cm^{-1}) em vez de fina e intensa aparece como um *shoulder* de intensidade diminuída. Em relação ao espectro de referência (Figura II.1, anexo II) não se verificam alterações em relação às bandas 1517 , 1272 , 1025 cm^{-1} , mas no que diz respeito ao estiramento da ligação O- NO_2 , volta a verificar-se um desvio de número de onda, aparecendo aos 822 em vez de aos 848 cm^{-1} e constata-se também um alargamento da base acompanhada por diminuição de intensidade. Os espectros obtidos mostram para além das bandas características do NC

as bandas 1369 e 1320 cm^{-1} que podem ser referentes às deformações do grupo NO_2 . Shashoua e colaboradores (1992) referem que estas bandas podem ser consequência da hidrólise do éster do nitrato (com aparecimento de grupos hidroxilo) bem como da formação de radicais RCHO^\bullet na sequência da oxidação fotoquímica do NC. Segundo a literatura, estes resultados são sugestivos de uma possível degradação do composto (NC) mas tendo em conta que as análises realizadas não foram quantitativas nem semi-quantitativas não podemos afirmar que estejamos perante a degradação do NC, até porque nos estudos efetuados não foi realizada este tipo de monitorização.

As análises realizadas e já apresentadas na área central do ambrótipo excluem a hipótese do mesmo ter sofrido envernizamento pois nenhum composto orgânico (para além do NC) foi identificado mas a observação do negativo apontava para a utilização de um composto orgânico nas margens do mesmo. Foram realizadas análises na margem lateral direita para identificar o tipo de composto que ali estava presente (Fig. 3.22).

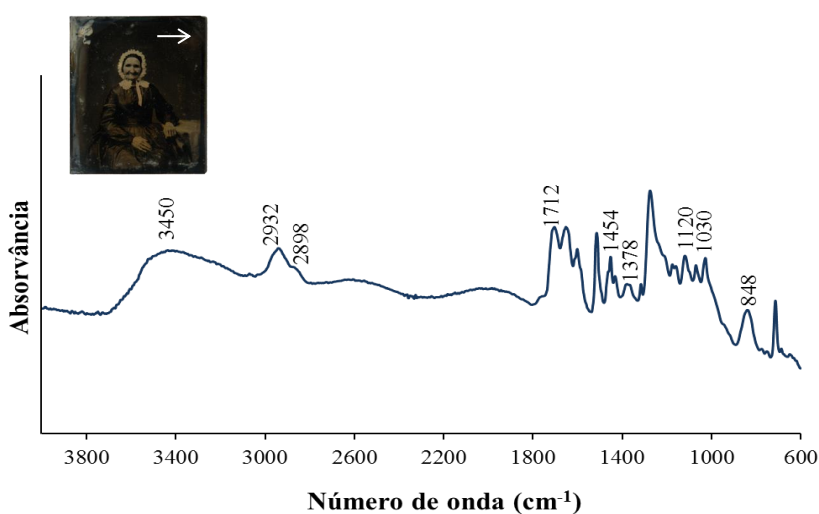


Figura 3.22. Espetro de μ -FT-IR do ponto assinalado, numa área que apresenta um composto orgânico.

O composto foi identificado segundo as suas bandas características: 3450, 2932 e 2898 cm^{-1} que correspondem ao estiramento simétrico OH e CH_2 , respetivamente; 1705 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico $\text{C}=\text{O}$ e 1454 e 1378 cm^{-1} que são relativas à deformação da ligação C-H. Por último, as bandas 1120 e 1030 cm^{-1} dizem respeito ao estiramento simétrico C-O e a banda característica 848 cm^{-1} é atribuída a diferentes vibrações consoante os autores: *rocking* CH_2 segundo Arjunan (2003) ou à deformação da ligação $\text{C}=\text{C}$ como referem Delor e colaboradores (1996). A comparação do espetro obtido com a base de dados disponíveis na base de dados do equipamento e no IRUG permite a identificação deste composto como uma resina natural triterpénica, possivelmente uma resina damar. A utilização desta resina teria provavelmente como principal objetivo aumentar a aderência entre a superfície do negativo e o separador metálico que era colocado sobre o mesmo. Alguns autores referem a utilização de resinas no envernizamento de ambrótipos com uma finalidade estética e de proteção da imagem, a qual era espalhada de modo uniforme sobre toda a superfície (Rogge, 2013; Hemmenaway, 2000). Quanto à utilização destas resinas como adesivos para fixar o separador ao suporte da imagem, tanto quanto se sabe, não parecem existir referências.

Na figura 3.23 são apresentados os diferentes espectros obtidos numa área que não apresentava degradações superficiais visíveis e numa área visivelmente colonizada por microrganismos. Da área não degradada e não colonizada obteve-se um espectro em que são visíveis as bandas características de NC. As diferenças entre ambos os espectros verificam-se nas alterações que ocorrem no estiramento da ligação N-H ($3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) que no espectro correspondente à área colonizada apresenta um máximo aos 3289 cm^{-1} ao contrário da área aparentemente não colonizada, na qual aparece aos 3397 cm^{-1} . Verifica-se também que a intensidade da primeira é superior à última. A vibração da ligação N-H e C-H ($3200\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) está fortemente associada à presença de microrganismos, mas dada a composição química da amostra, encontra-se certamente influenciado por esta. O aumento de intensidade tanto na região NH como na OH permite indicar a presença de colonização microbiológica, já observada por MO e MEV (Giacomucci *et al.* 2012).

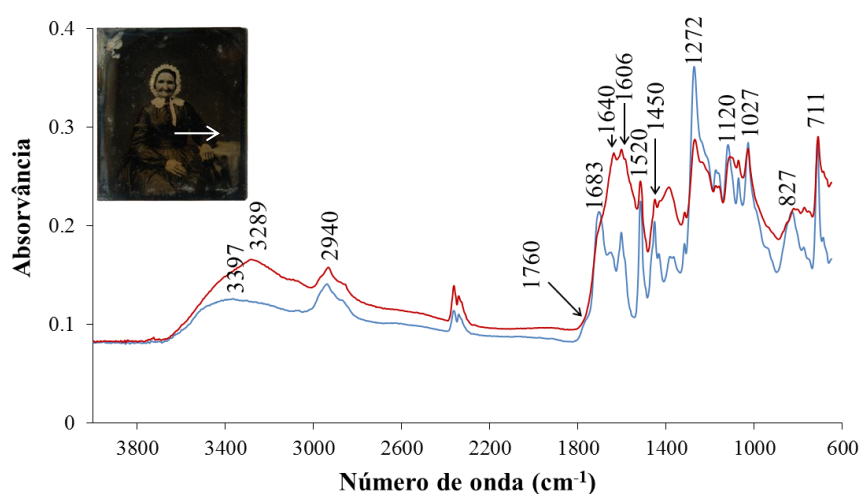


Figura 3.23. Espectros de μ -FT-IR da amostra A1 de uma área visivelmente não colonizada (azul) e de uma área colonizada por microrganismos (vermelho).

A presença das bandas aos 1640 , 1520 e 1450 cm^{-1} está associada à vibração I, II e III do grupo amida, respetivamente, que não estando presente na análise realizada em regiões aparentemente não colonizadas, apontam de facto para a presença de material biológico. É visível a diferença de intensidades na banda que corresponde à amida I (1640 cm^{-1}), sendo que no espectro área aparentemente não colonizada esta banda é muito pouco intensa. O aumento de intensidade da área colonizada poderá estar relacionado com a presença de grupos amina (N) que podem resultar do processo de desnitrificação do composto por microrganismos. No que diz respeito à banda 1027 cm^{-1} é visível uma ligeira alteração, e apresenta intensidade superior na área não colonizada. A banda do estiramento da ligação O-NO₂ (827 cm^{-1}) apresenta uma intensidade inferior na área colonizada. Estes resultados sugerem que existe colonização microbiológica no NC. Relativamente ao ambrótipo A2, foram igualmente realizadas análises em áreas seleccionadas que se consideram representativas.

Como A1 demonstrou a presença de resina nas margens laterais, foi realizada uma análise ao canto superior esquerdo de A2 com o intuito de perceber se se verificava a mesma situação. Da análise realizada a esta área resultou o espectro apresentado na figura 3.24, no qual se verificaram bandas características de vidro, mais precisamente, de um vidro com uma constituição base de SiO₂. A banda aos 949 cm^{-1} diz respeito ao estiramento da ligação Si-O(Si) (Tooh *et al.* 2013) enquanto

779 cm^{-1} está associada à ligação Si-O-Si (Lee, Y-K. *et al.*, 1997). Estes resultados permitem concluir que ao contrário do que acontece com A1, neste ambrótipo não existe presença de material orgânico nas suas margens. Relativamente à composição do vidro, estes resultados estão em concordância com os resultados elementares já obtidos por MEV-EDS.

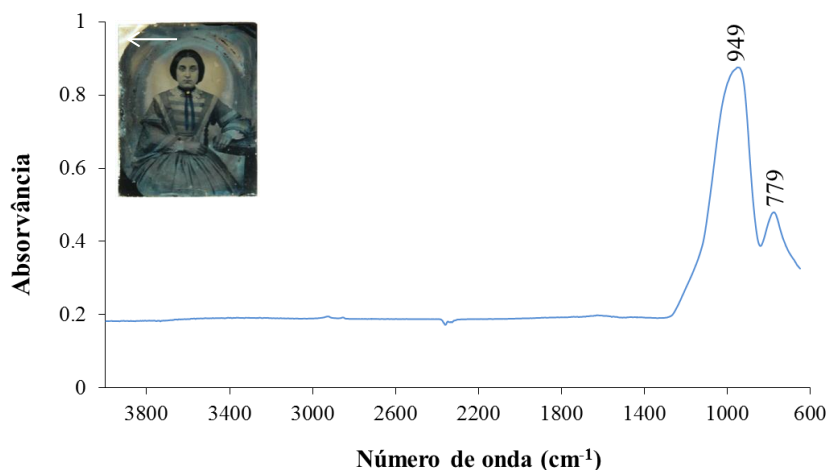


Figura 3.24. Espectro de μ -FT-IR da amostra A2 de uma análise num ponto no canto superior esquerdo.

Relativamente à figura 3.25, é referente a um espectro obtido a partir de uma análise a uma área que visivelmente demonstra degradações superficiais e uma segunda área degradada, esta que não demonstra degradações superficiais, correspondem aos pontos *a* e *b*, respetivamente.

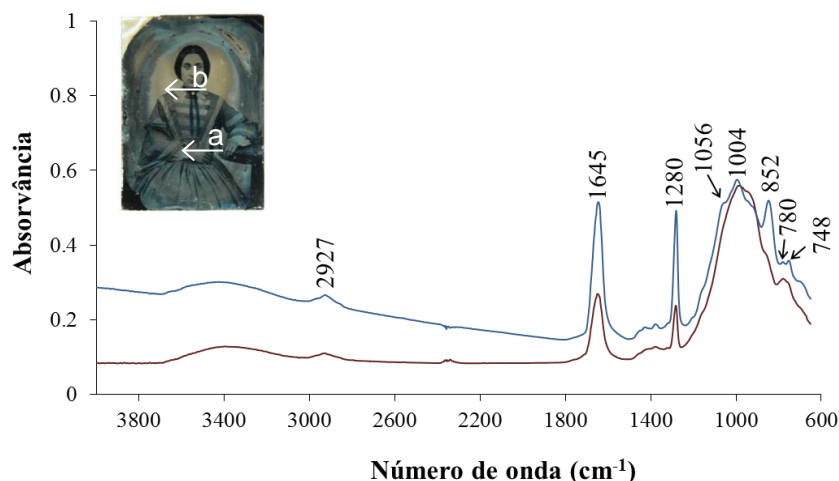


Figura 3.25. Espectros de μ -FT-IR da amostra A2: *a*) área degradada (vermelho); *b*) área visivelmente não degradada (azul).

Os espectros obtidos são semelhantes aos que resultaram da análise à amostra A1. Evidenciam-se as bandas características dos grupos nitró, $1645, 1280, 848, 753\text{ cm}^{-1}$ que confirmam que a matriz em análise é o NC. Quando se comparam ambos os espectros é visível um decréscimo de intensidade das bandas dos grupos nitró. Segundo Cakić (2007) e Berthumeyrie (2014) e respetivos colaboradores a diminuição da intensidade destas bandas pode ser devida à exposição do composto a

radiação desadequada, o que poderá originar a desnitrificação progressiva do nitrato de celulose. Note-se que a banda que aparece no espectro da área visivelmente não degradada aos 852 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação NO, apresenta uma intensidade muito inferior no espectro da área degradada.

No espectro da figura 3.26 está apresentada uma análise a uma área visivelmente não colonizada por microrganismos e uma área colonizada.

À semelhança de A1, a espécie fotográfica A2 encontra-se colonizada por microrganismos e essa presença é denunciada pelas bandas das amidas I, II e III aos 1648 , 1546 e 1455 cm^{-1} respetivamente. Adicionalmente a este grupo de bandas verifica-se a alteração da banda na região do grupo NH, que apresenta um máximo aos 3280 cm^{-1} . Para além destas, as bandas características do grupo nitro perderam intensidade relativamente à área visivelmente não colonizada (note-se esse efeito nas bandas 1650 , 1280 e a ausência da banda aos 848 cm^{-1}). Mais uma vez e tal como referido anteriormente, estes resultados são indicativos da presença de colonização microbiológica nos ambrótipos, o que vem sustentar os resultados obtidos por MO e MEV.

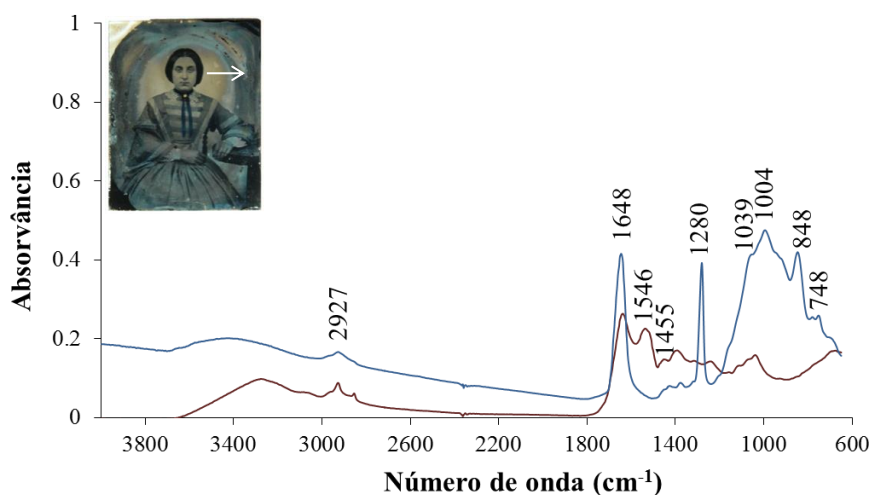


Figura 3.26. Espectros de μ -FTIR da amostra A2: área visivelmente não colonizada (azul); área colonizada por microrganismos (vermelho).

3.1.5. Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman)

As análises a objetos considerados património cultural são um dos campos mais auspiciosos de aplicação da micro-espectroscopia de Raman uma vez que é bastante sensível, fidedigna e é não destrutiva. O facto de poder ser utilizada diretamente sem ser necessária uma preparação prévia das amostras representa uma enorme vantagem (Castro *et al.* 2005).

No caso das espécies fotográficas em estudo, a micro-espectroscopia de Raman foi utilizada essencialmente na caracterização de patologias associadas à degradação da prata. Para tal, foram analisadas áreas não degradadas e visivelmente degradadas em ambas as amostras. Foram realizadas várias análises ao ambrótipo A1 mas a maioria dos espectros apresentava muita fluorescência. Selecionaram-se dois pontos de análise que serão aqui discutidos.

Apresenta-se na figura 3.27 o espectro obtido na análise de uma área visivelmente degradada, que evidencia a presença de duas bandas, uma aos 122 cm^{-1} e outra aos 232 cm^{-1} . A primeira está

associada aos modos de vibração de Ag e a segunda com a vibração da ligação Ag-Cl (Marucci *et al.* 2014; Centeno *et al.* 2011). Análises realizadas por MEV-EDS também identificaram cloro nesta mesma área, o que confirma a presença de AgCl.

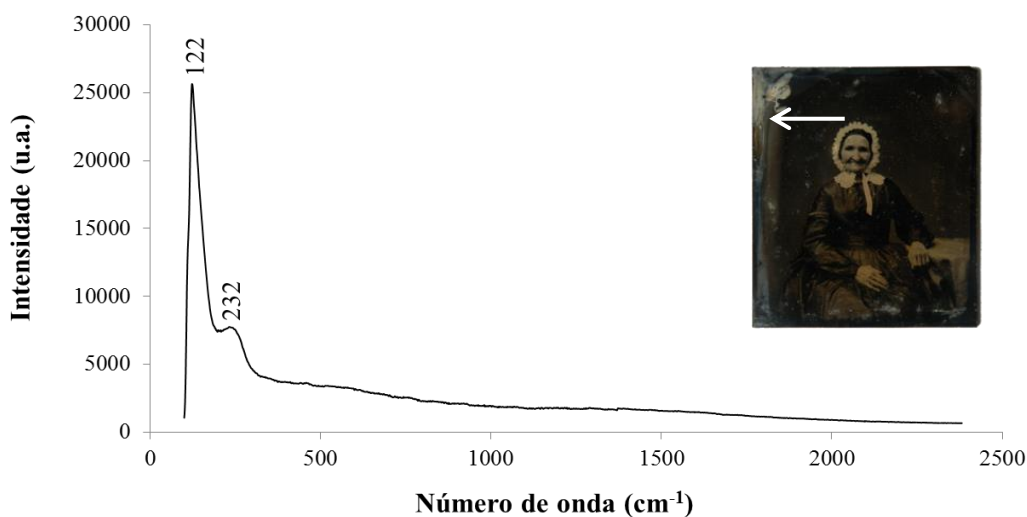


Figura 3.27. Espectro de μ -Raman da amostra A1 sugerindo a presença de AgCl.

O espectro de μ -Raman do segundo ponto de análise é apresentado na figura 3.28.

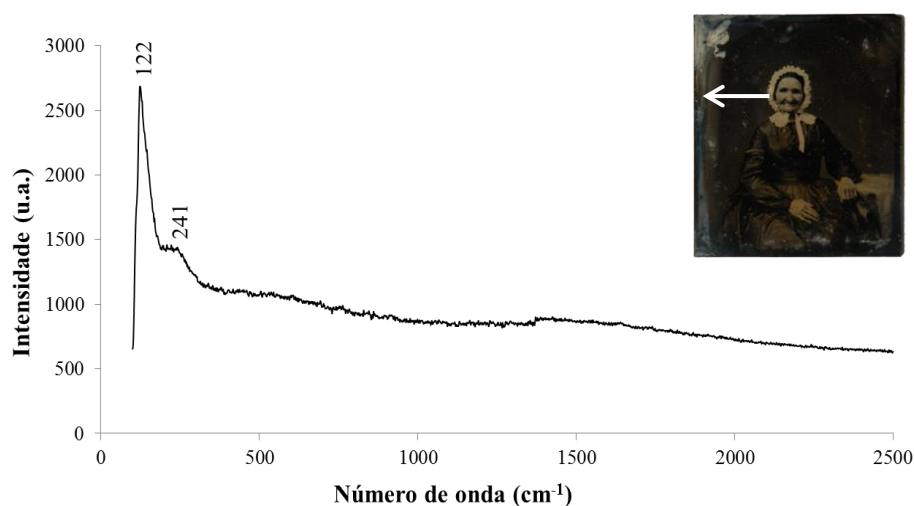


Figura 3.28. Espectro de μ -Raman da amostra A1 sugerindo a presença de Ag₂S.

O espectro obtido nesta região apresenta agora uma banda a 241 cm⁻¹. Este desvio pode indicar que estamos perante a presença de sulfureto de prata. Como já foi referido, a banda aos 122 cm⁻¹ corresponde à vibração de Ag enquanto a 241 cm⁻¹ poderá dizer respeito ao estiramento da ligação Ag-S. Estes resultados foram comparados com espectros obtidos em análises realizadas a compostos padrão (AgCl (cloreto de prata puríssimo, PANREAC) e Ag₂S (99,9% grau de pureza,

SIGMA) que foram propositadamente adquiridos e que se encontram apresentados na figura III.2, 3 do anexo III.

Os restantes pontos analisados não apresentaram diferenças relativamente aos apresentados apesar de serem em áreas distintas. A micro-espectroscopia de Raman revelou ser uma técnica vantajosa no sentido em que permitiu confirmar a presença de AgCl e Ag₂S na amostra, e desta forma confirmar os resultados elementares obtidos a partir do MEV-EDS.

Em relação à amostra A2, foram analisados igualmente vários pontos, dos quais se passam a apresentar dois resultados considerados representativos. O primeiro ponto de análise revelou a presença de bandas características dos modos de vibração da prata (Ag) e do estiramento da ligação Ag-S, 118 e 226 cm⁻¹, respetivamente, bem como, foram verificadas bandas típicas da fotodecomposição do composto Ag₂S (440 e 1423 cm⁻¹). As bandas do espectro apresentado (Fig. 3.29) foram comparadas com bandas dos espectros obtidos a partir de análises realizadas a compostos padrões adquiridos (Figura III.3 do anexo III).

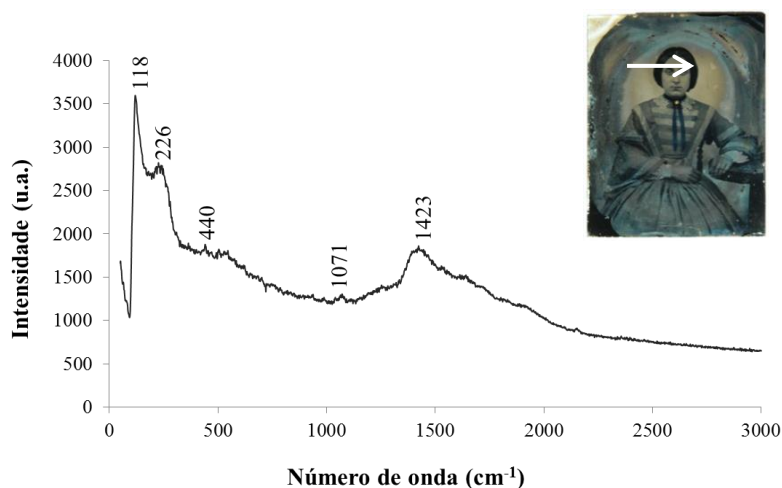


Figura 3.29. Espectro de μ -Raman da amostra A2 sugerindo a presença de bandas características da fotodecomposição de Ag₂S.

Na figura 3.30 encontra-se o espectro resultante da análise realizada aos cristais presentes na lateral esquerda do ambrótipo.

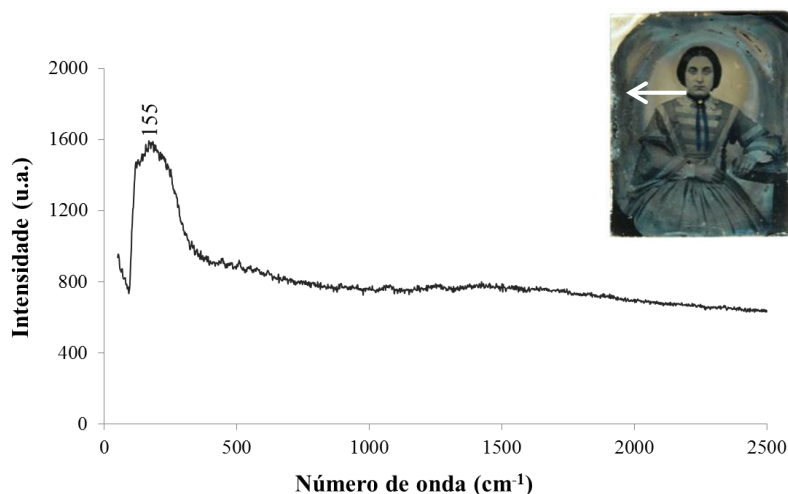


Figura 3.30. Espectro de μ -Raman da amostra A2 obtido a partir da análise a cristais sugerindo a presença de prata.

A única banda presente no espectro apresentado apareceu aos 155 cm^{-1} e corresponde aos modos de vibração de Ag, o que vem confirmar os resultados obtidos por MEV-EDS das análises realizadas aos cristais que indicavam que a constituição dos mesmos era maioritariamente prata.

3.1.6. Micro-difração de raios-X (μ -DRX)

A micro-difração de raios-X foi utilizada para avaliar compostos cristalinos presentes nas amostras em estudo quer usados na produção, quer resultantes da degradação das espécies. Infelizmente, esta técnica não forneceu muitos resultados, provavelmente devido ao facto de as amostras serem constituídas por uma fina camada depositada sobre vidro e os produtos de degradação formados estarem presentes em quantidades muito pequenas. Na Tabela IV.1 do anexo IV é feita a identificação das riscas de difração observadas nos difratogramas obtidos por comparação com as riscas dos difratogramas de prata metálica e iodeto de prata constantes na base de dados referida (cf. 2.3.2.7.).

No que diz respeito aos ambrótipos, foram analisadas áreas não degradadas e degradadas mas ambas as áreas apresentam comportamentos semelhantes.

Na Fig. 3.31 encontram-se apresentados os difratogramas da amostra A1 obtidos a partir de uma análise a duas áreas distintas, não degradada e degradada. No difratograma da área não degradada identificou-se a presença de prata metálica e no caso da área degradada verificou-se a presença de riscas de difração atribuídas ao iodeto de prata. Estes resultados foram comparados com difratogramas resultantes de análises a padrões que constam da base de dados do programa *Xpert Highscore*. As fichas ICDD da prata e iodeto de prata têm os respetivos códigos de referência, 01-089-3722 e 00-001-0503.

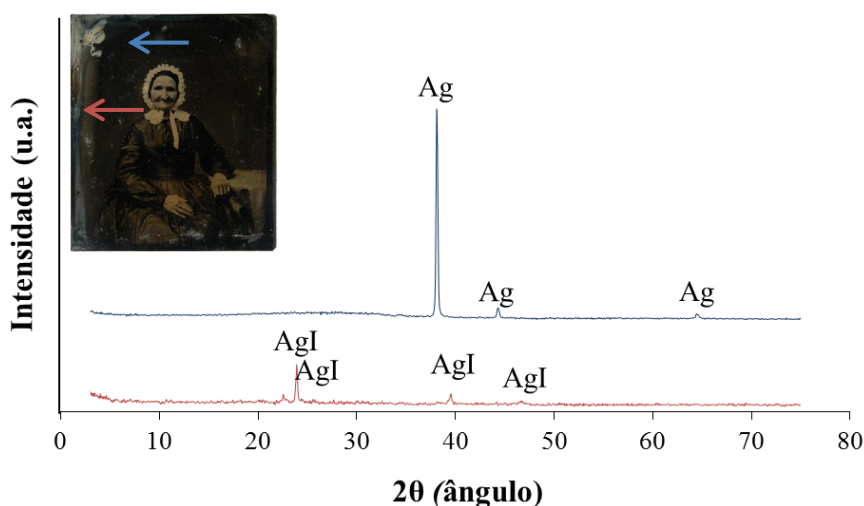


Figura 3.31. Difratogramas da amostra A1 de uma área visivelmente não degradada (azul) e degradada (vermelho) onde se verifica a presença de prata (Ag) e iodeto de prata (AgI), respetivamente.

A análise de DRX vem confirmar a presença de iodeto de prata na área analisada pois a partir do MEV-EDS já tinham sido identificados os elementos iodo e prata nessa mesma área. Este resultado mostra, de facto, a formação do sal de prata como composto fotossensível, proveniente da reação entre o nitrato de prata de o iodeto de um metal. Este composto foi removido de modo

ineficiente e terá provavelmente contribuído para o processo de degradação da imagem. Possivelmente por se encontrar numa região protegida pelo separador metálico o processo de redução da prata por ação da luz foi, de certo modo, travado e daí que o composto tenha chegado até aos nossos dias.

Quanto ao ambrótipo A2, as análises realizadas às diferentes áreas, não degradadas e degradadas não permitiram a obtenção de outro resultado que a presença de prata metálica.

3.2. Caracterização microbiológica de ambrótipos

3.2.1. Isolamento e identificação de espécies microbianas

Para efeitos de caracterização microbiológica dos ambrótipos foi realizado o isolamento microbiano a partir de amostragem em áreas visivelmente degradadas. Para a espécie A1, foram isolados sete estirpes fúngicas distintas e três estirpes bacterianas. De acordo com a observação das estruturas reprodutoras alguns dos isolados fúngicos foram identificados ao nível de género. Foram isoladas cinco estirpes distintas de género *Penicillium*, uma estirpe de *Ulocladium* sp. e ainda um micélio (Tabela 3.10).

Tabela 3.10. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A1.


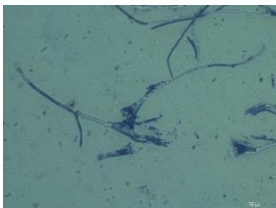

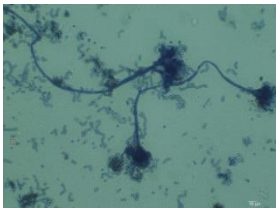





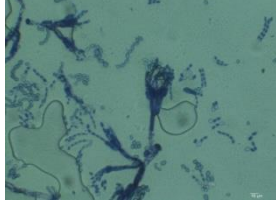
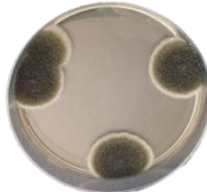
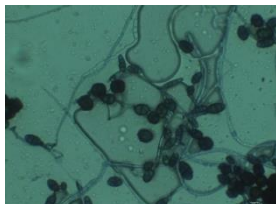


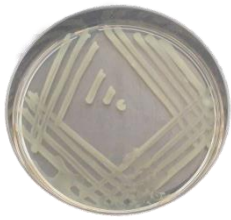

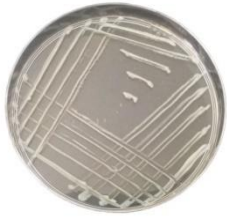
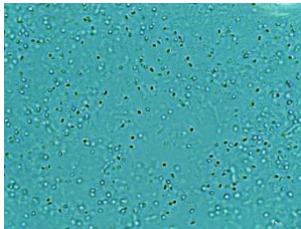
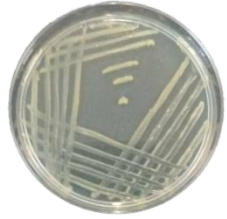
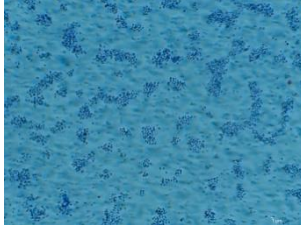
A1			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
A _{2_3b}			<i>Penicillium</i> sp.1
A _{4_1}			<i>Penicillium</i> sp.2
A _{4_4}			<i>Penicillium</i> sp.3

Tabela 3.10. Continuação. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A1.

A1			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
A _{5_1b}			Micélio
A _{5_1v}			<i>Penicillium</i> sp.4
A _{6_1}			<i>Ulocladium</i> sp.1
A _{6_4b}			<i>Penicillium</i> sp.5

No que diz respeito às estirpes bacterianas, todas as isoladas foram estirpes de cocos Gram negativos (Tabela 3.11). A presença de colonização microbiológica para além de indicar um estado de conservação alterado sugere o envolvimento dos microrganismos colonizadores em processos degradativos que afetam as espécies fotográficas.

Tabela 3.11. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra A1.

A1		
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico
A _{2_5}		
A _{6_4a}		
A _{6_5}		

A amostra A2 está visivelmente mais degradada que A1 mas no entanto apenas foram isoladas três estirpes distintas de *Penicillium* sp. (Tabela 3.12). A espécie fotográfica A2 não tinha sobre a sua superfície qualquer produto orgânico detetável (resinas, colas, vernizes, entre outros) ao contrário de A1 que apresentou resina nas margens, podendo esta acessibilidade a substratos ser um fator determinante para a presença de microrganismos. Para além disto, A2 apresenta degradações intimamente ligadas à oxidação da prata, o que à partida indica uma elevada quantidade de prata metálica à superfície, o que pode representar uma barreira ao desenvolvimento microbiano.

Tabela 3.12. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A2.

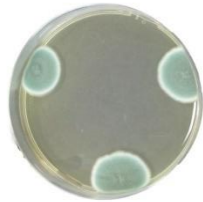
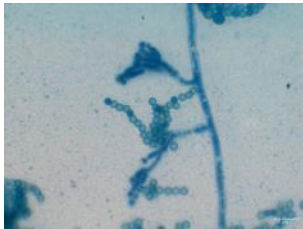

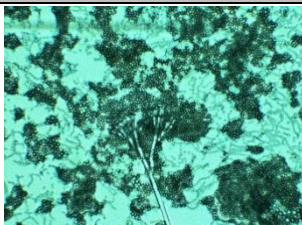

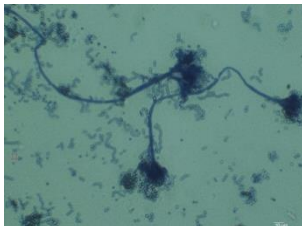
A2			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
A _{1_1}			<i>Penicillium</i> sp.6

Tabela 3.12. Continuação. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra A2 e respetiva designação.

A2			
denominação	denominação	denominação	denominação
A _{2_2}			<i>Penicillium</i> sp.7
A _{4_4}			<i>Penicillium</i> sp.8

Relativamente a estirpes bacterianas, isolou-se uma estirpe de bacilo Gram negativo (A_{1_3}), duas estirpes de cocos Gram positivos (A_{2_3}, A_{4_4}) e uma estirpe de cocos Gram negativos (A_{4_5}). Na Tabela 3.13 apresentam-se os isolados bacterianos.

Tabela 3.13. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra A2.


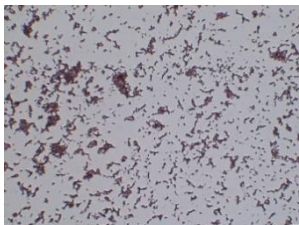





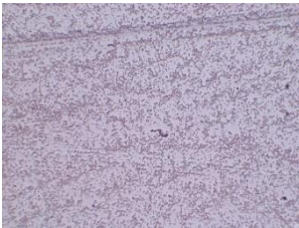
A2		
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico
A _{1_3}		
A _{2_3}		

Tabela 3.13. Continuação. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra A2.

A2		
denominação	denominação	denominação
A _{4_4}		
A _{4_5}		

Mais uma vez se confirma a existência de contaminação microbiológica na superfície da espécie fotográfica, neste caso na A2. Este é um facto que pode relacionar os microrganismos contaminantes com as degradações que os ambrótipos apresentam.

3.2.2. Avaliação do potencial biodeteriogénico de isolados fúngicos

Considerando o material base de composição das espécies fotográficas (nitrato de celulose) e os microrganismos isolados, foram efetuados ensaios para a avaliação da atividade celulolítica dos sete isolados fúngicos da amostra A1. Como controlo positivo foi utilizado um fungo de atividade celulolítica conhecida, *Trichoderma harzianum* (CCMI 783) que pertence a uma Coleção de Culturas da Unidade de Biodegradação e Biotecnologia do Laboratório HERCULES – Universidade de Évora. O ensaio efetuou-se em culturas líquidas destes microrganismos e monitorizou-se durante 10 dias de crescimento, conforme a descrição feita na secção da Metodologia (cf. 2.2.2). O meio de cultura utilizado para a realização do ensaio foi o meio Basal (anexo I) suplementado com carboximetilcelulose. Os resultados da atividade celulolítica para cada isolado fúngico encontram-se apresentados na figura 3.32.

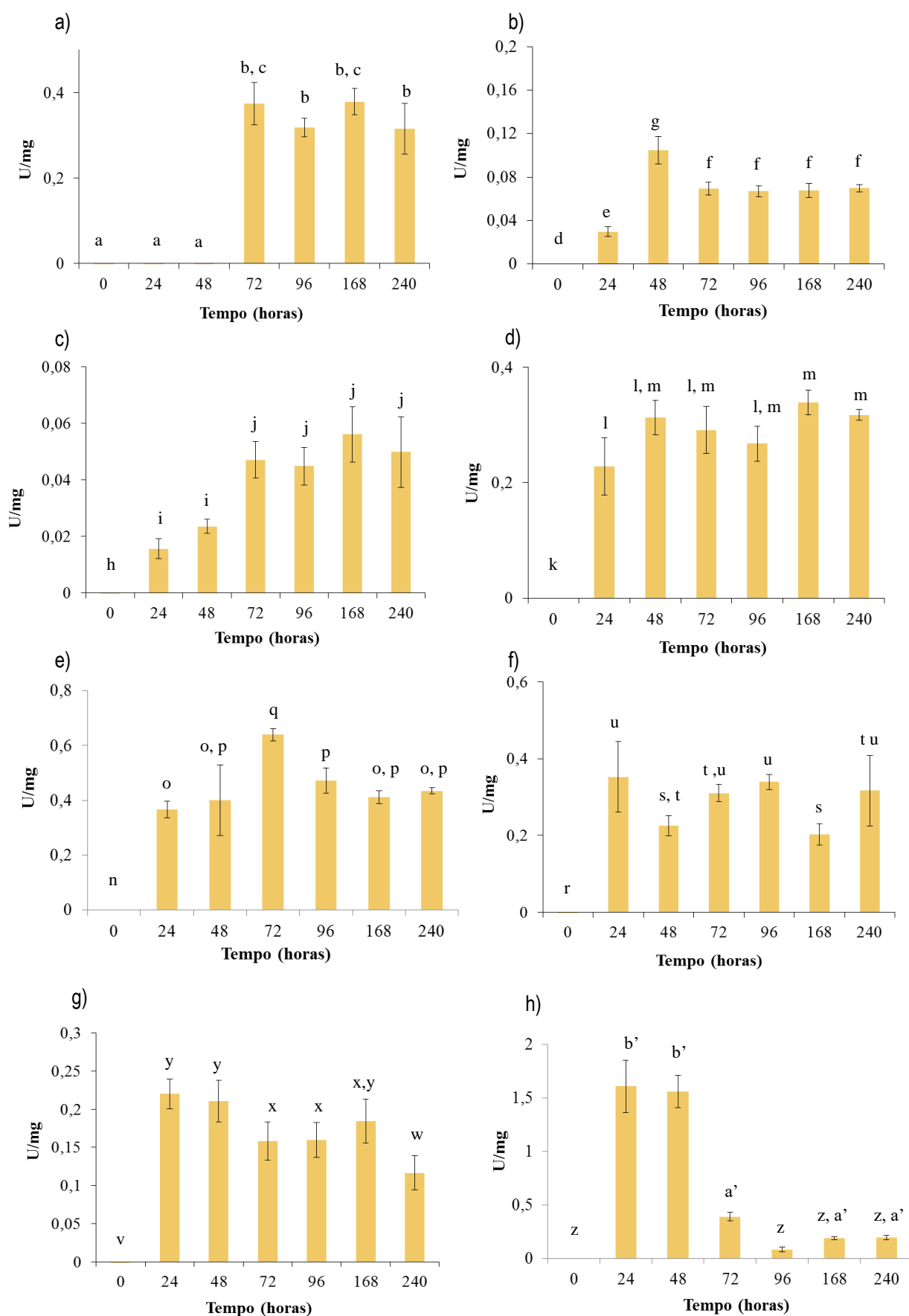


Figura 3.32. Atividade celulolítica específica de culturas em meio Basal dos fungos oriundos de A1 com dez dias de incubação. a) *Penicillium* sp.1; b) *Penicillium* sp.2; c) *Penicillium* sp.3; d) Micélio; e) *Penicillium* sp.4; f) *Ulocladium* sp.1; g) *Penicillium* sp.5; h) *Trichoderma harzianum* CCMI 783. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05).

As atividades enzimáticas específicas mostraram que a atividade metabólica das estirpes em cultura foi diferente para os diferentes isolados. Os isolados *Penicillium* sp.1 e 4, *Micélio* e *Ulocladium* sp.1 foram os que demonstraram atividades específicas mais elevadas. A atividade específica máxima (para além do fungo *Trichoderma harzianum* CCMI 783 – controlo positivo) foi detetada no *Penicillium* sp.4 com o valor de 0.63 U/mg às 72h de cultura, verificando-se uma diminuição na produção de enzimas no final do ensaio. *Penicillium* sp.1, *Micélio* (A5_1b) e *Ulocladium* sp. apresentam capacidade semelhante de produção de enzimas e atingem valores entre os 0.31 e 0.37 U/mg que corresponde a cerca de metade da produção do *Penicillium* sp.4. Os isolados com atividade específica mais baixa foram *Penicillium* sp. 2, 3 e 5. No que diz respeito ao *Trichoderma harzianum* CCMI 783, verificou-se uma produção de celulasas superior a qualquer um dos restantes isolados com o máximo de atividade, 1.60 U/mg às 24h de cultura. É conhecido o potencial das estirpes de *Trichoderma* na produção de celulasas, bem como de algumas estirpes do género *Aspergillus* e *Penicillium* que têm sido citadas como bons produtores destes enzimas (Puškárová *et al.* 2016, El Bergadi *et al.* 2014). Segundo o nosso conhecimento, relativamente a ambrótipos não existem até à data presente quaisquer estudos que relacionem a biodegradação/biodeterioração que os acompanha com atividades celulolíticas. Os resultados obtidos permitem concluir que as estirpes fúngicas em estudo têm capacidade de produção de celulasas. Estes resultados são importantes no contexto da degradação de ambrótipos, na medida em que são indicativos da capacidade destes microrganismos se desenvolverem numa matriz de celulose e podem desta forma apresentar uma ação biodeterioragénica nos ambrótipos em estudo.

No sentido de avaliar o potencial biodeterioragénico, selecionou-se o isolado fúngico que apresentou a atividade celulolítica máxima (*Penicillium* sp. 4) para a realização de ensaios de simulação que visavam a determinação da atividade celulolítica deste isolado fúngico numa matriz constituída por ambrótipo contemporâneo e ainda determinar a viabilidade e proliferação celular, do isolado nesta mesma matriz a partir do teste de MTT. Para tal, os ensaios foram montados consoante a descrição que se encontra na seção da Metodologia (cf. 2.2.2.1.). A figura 3.34 apresenta o esquema metodológico utilizado.

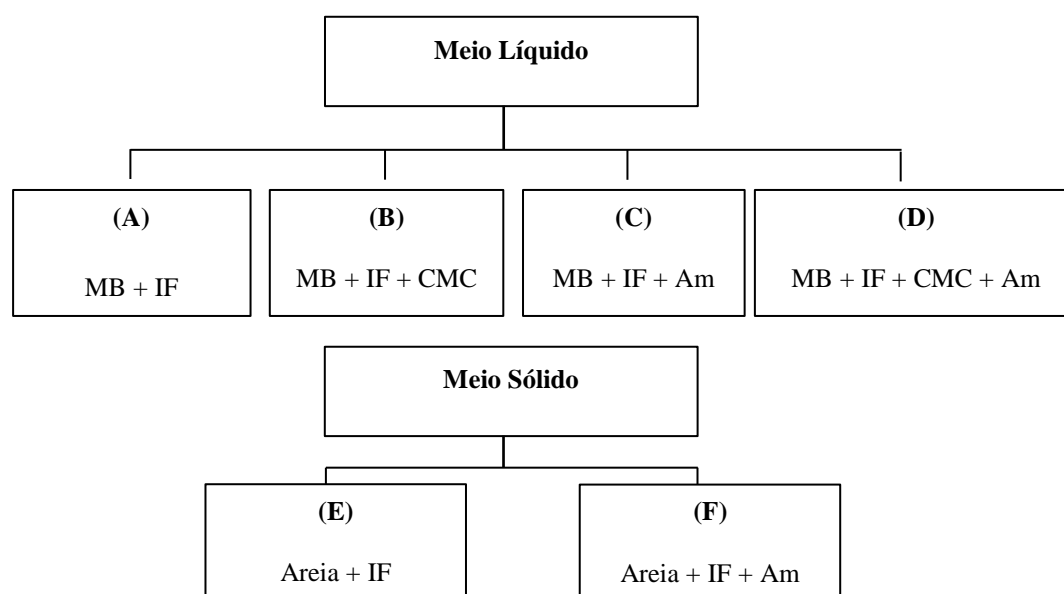


Figura 3.33. Esquema ilustrativo dos ensaios de simulação.

MB - Meio Basal; IF – Isolado Fúngico; CMC - Carboximetilcelulose; Am – amostra de ambrótipo contemporâneo.

A realização do ensaio em meio líquido permitiu determinar a atividade celulolítica específica, figura 3.34, para as diferentes culturas efetuadas (A-D).

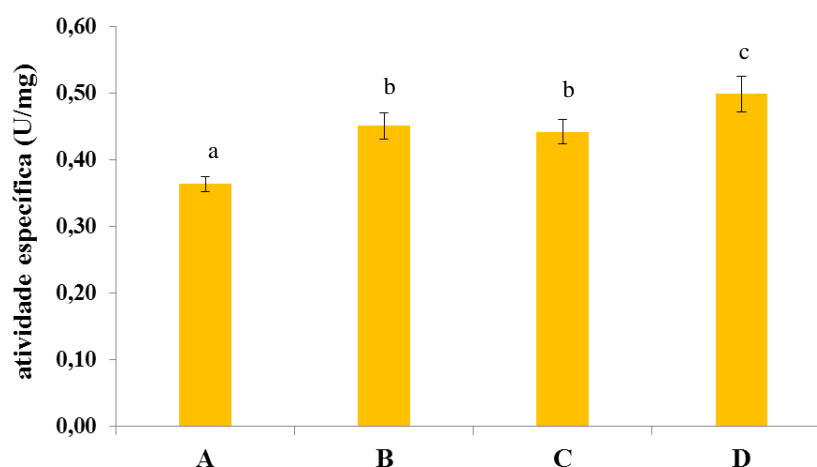


Figura 3.34. Atividade celulolítica específica ao fim de 7 dias, relativa aos ensaios em meio líquido. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Estes ensaios permitiram verificar que em qualquer das culturas existe produção de celulasas aos sete dias de incubação. O ensaio A apresenta a atividade celulolítica específica mais baixa com um valor de 0.36 U/mg. A mais elevada foi verificada para o ensaio D com um valor de 0.49 U/mg. Os ensaios em que o meio se encontrava suplementado com CMC apresentaram sempre valores superiores, quando comparados com os ensaios em que não existia essa suplementação.

Sublinham-se os resultados dos ensaios C e D. Note-se que nestes estava inoculada a amostra, sendo que na primeira o meio de cultura não tinha CMC ao contrário da segunda. Ambos os ensaios para além de evidenciarem a produção de celulasas apresentam valores superiores ao controlo A, o que à partida é indicativo não só do desenvolvimento celular neste meio mas também da capacidade de biodegradação/biodeterioração visto que a produção de celulasas é realizada quando a única fonte de carbono é o nitrato de celulose presente na solução fotográfica. O facto do valor mais elevado de atividade enzimática específica ser no ensaio G é justificável pela presença de CMC no meio de cultura.

É possível concluir com estes resultados que o isolado fúngico testado (*Penicillium* sp. 4) apresenta capacidade para se desenvolver e utilizar a solução fotográfica como substrato provocando desta forma danos que culminam na biodegradação/biodeterioração desta espécie fotográfica. O ensaio em meio sólido teve como principal objetivo detetar o desenvolvimento e viabilidade celular do isolado fúngico na presença de ambrótipos contemporâneos (matriz em estudo). O desenvolvimento celular verificou-se pela observação microscópica de hifas e de estruturas reprodutoras, indicativo de crescimento celular durante o ensaio. (Fig. 3.35). A viabilidade celular foi estimada através da realização do teste de MTT teste de MTT e baseia-se na capacidade de células vivas reduzirem o sal de MTT a cristais de formazão (Rosado *et al*, 2013).

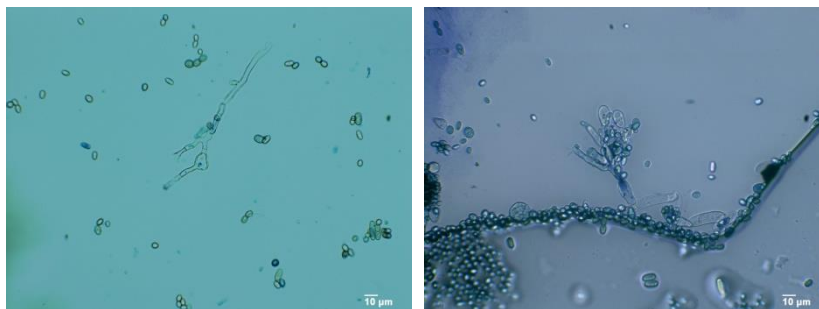


Figura 3.35. Figura 3.35. Imagens de microscopia ótica que evidenciam a presença de esporos e estruturas reprodutoras no ensaio F.

A contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) no final deste ensaio F, correspondeu a um aumento de cerca de 20 vezes relativamente ao início do ensaio e parece ser comprovativo da capacidade de utilização desta matriz como substrato por parte destes microrganismos, que também apresentam capacidade de proliferação, evidenciado mais uma vez o potencial biodeteriorogénico dos microrganismos utilizados. Alguns autores sublinham a importância da contaminação microbiológica por fungos filamentosos pela presença de hifas que têm uma elevada capacidade de dispersão pela superfície das espécies e de penetração no substrato, o que pode levar à desintegração das fotografias, aparecimento de lacunas, alterações cromáticas e em casos de biodegradação muito avançada podem comprometer a estrutura física do suporte fotográfico (vidro) através da microcristalização deste (Lourenço & Sampaio, 2009; Capitelli & Sorlini, 2008; Abrusci et al. 2005).

Na determinação da viabilidade celular através do método do MTT, a redução do MTT é feita através de desidrogenases celulares que apenas são produzidas por células metabolicamente ativas. Realizou-se um ensaio prévio para testar a aplicabilidade deste método na deteção da viabilidade celular do isolado fúngico em estudo ($A_{5_{1v}}$) (fig. VI.3 do anexo VI) e os resultados permitiram detetar atividade MTT, cujo aumento foi proporcional à concentração celular.

No ensaio em meio sólido, na presença da matriz em estudo (ambrótipo contemporâneo) avaliou-se a atividade MTT no início do ensaio e após sete dias de incubação, sobre as condições referidas anteriormente (cf. 2.3.3.6.ii). Verificou-se um aumento de atividade MTT de 11,4%, o que mais uma vez mostra que estes microrganismos têm capacidade de se manter metabolicamente ativos e de crescer neste tipo de matrizes.













Estes resultados permitem acrescentar alguma informação relativa ao possível envolvimento dos fungos filamentosos na biodegradação de espécies fotográficas pois tanto quanto se sabe, até à data não existem estudos de simulação de contaminação biológica em ambrótipos.

3.3. Caracterização morfológica e química de negativos de gelatina

3.3.1. Fotografia técnica

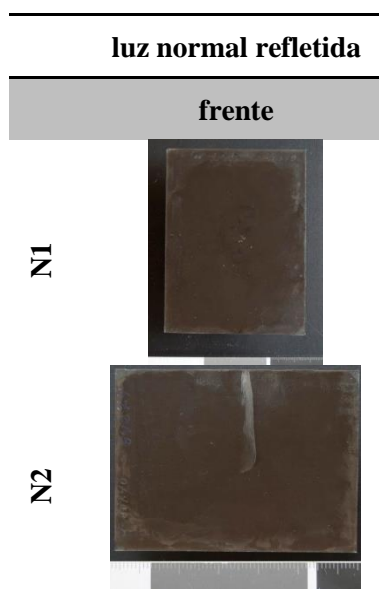
À semelhança do procedimento utilizado para documentar as amostras A1 e A2, o mesmo foi executado para os negativos de gelatina, N1 e N2. Estes negativos foram fotografados sob as diferentes iluminações (Tabela 3.14) para que se concluísse acerca do estado de conservação, morfologia e patologias presentes.

Tabela 3.14. Imagens fotográficas dos negativos N1 e N2 sob diferentes iluminações.

	luz normal refletida	luz transmitida	luz rasante	radiação UV
frente				
N1				
	verso			
N2				
	verso			
N2				

Todas as fotografias apresentadas à exceção das de luz rasante foram adquiridas sobre um fundo branco. As imagens obtidas sob luz natural refletida permitiram observar manchas superficiais nas espécies que se tornam indicadores primários da condição de espelho de prata. Partículas de sujidade sobre toda a superfície foram também verificadas. Para além das degradações visíveis, destaca-se a presença de retoque fotográfico¹. Nas fotografias adquiridas sobre fundo preto esta condição torna-se muito mais evidente (Tabela 3.15).

Tabela 3.15. Imagens fotográficas dos negativos N1 e N2 fotografias com luz normal refletida sobre fundo negro.



São evidentes as áreas onde foram aplicados os materiais utilizados com este efeito, denunciadas pela alteração do reflexo da superfície do negativo. Segundo Pereira (2010) um dos primeiros passos no procedimento de retoque era a aplicação de uma goma sobre toda a superfície das espécies ou apenas nas áreas a retocar com o objetivo de melhorar a aderência aos materiais de retoque que eram aplicados posteriormente. Essa aplicação reconhece-se sobre a superfície de N1 e N2 com exceção dos cantos. A partir destas imagens são ainda facilmente destacados riscos muito particulares em ambos os negativos mas mais marcados em N1 no qual parecem desenhar a forma da face ao contrário do que acontece com N2, em que apenas se verificam riscos que parecem dividir a imagem ao meio. Citando Pereira (2010), este procedimento denomina-se formação de grão e refere-se à criação de interferência visual de modo a dar uma superfície mais lisa e regular aos negativos tendo como função principal a atenuação de marcas na pele e era geralmente executado com recurso a lápis de grafite.

A luz rasante evidenciou as poucas acreções que as amostras apresentavam mas através desta iluminação não se verificaram lacunas nem destacamentos. Os riscos superficiais foram evidenciados pela luz transmitida, tal como algumas alterações nos tons das espécies. As duas amostras quando expostas à radiação UV apresentaram uma luz intensa azulada sobre toda a superfície mas não foi

¹ O retoque fotográfico em negativos de gelatina em suporte de vidro era uma técnica utilizada que compreendia motivos estéticos e/ou de correção de defeitos óticos, dos materiais ou de processamento de imagem (Pereira, C. 2010).

observada fluorescência. Como já foi referido, a fluorescência corresponde ao fenómeno da alteração da cor que estes refletem quando iluminados por radiação de determinados comprimentos de onda (Davidhazy, 2002), e neste caso não se verifica este comportamento. As imagens sugerem que não existe fluorescência da radiação UV e a luz azulada que se observa poderá corresponder ao reflexo da iluminação utilizada. Davidhazy (2002) acrescenta ainda que relativamente à gelatina (matriz destas espécies fotográficas) em condições de comprimentos de ondas muito curtos pode absorver a radiação incidente não se verificando qualquer fluorescência.

3.3.2. Microscopia ótica

Estas espécies foram também observadas num microscópio estereoscópico e microscópio ótico de campo escuro (Tabela 3.16 e 3.17). Segundo as imagens adquiridas constata-se que ambos os negativos apresentam um estado de conservação razoável. Destacam-se a presença de patologias como a presença de sujidades, manchas e riscos sobre a superfície, particularmente nas margens laterais. Verificam-se algumas lacunas e destacamento da imagem possivelmente associada à condição física que o vidro de suporte apresenta.

Tabela 3.16. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando diferentes deteriorações bem como a presença de retoque fotográfico nas amostras N1 e N2.

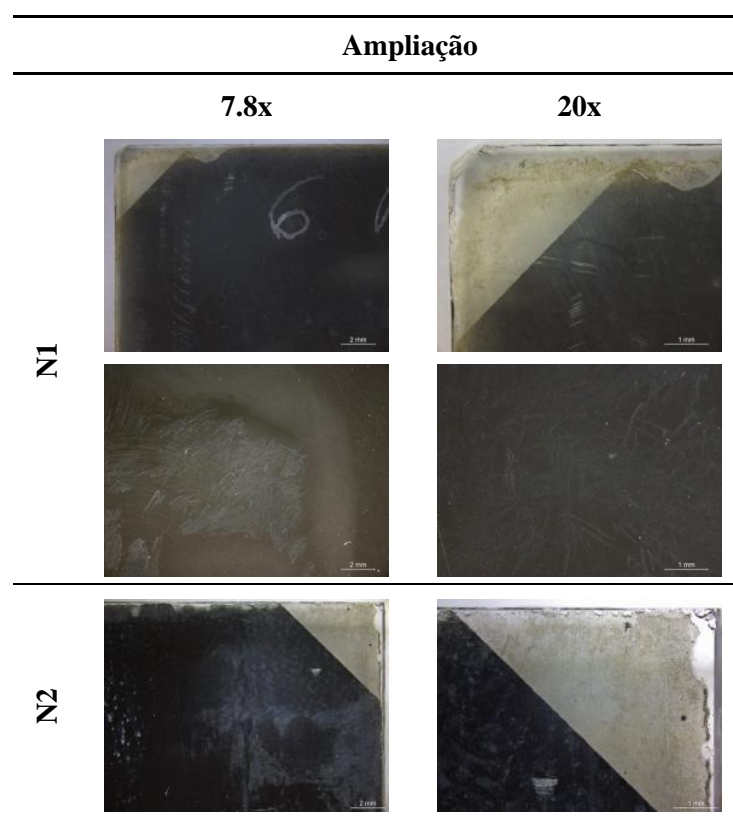

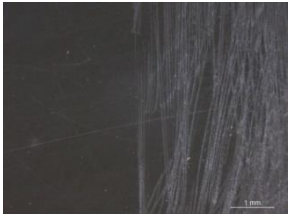


Tabela 3.16. Continuação. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico apresentando diferentes deteriorações bem como a presença de retoque fotográfico nas amostras N1 e N2.

Ampliação	
7.8x	20x
N2	
	

Tal como indicam as imagens obtidas através de fotografia técnica, a partir da microscopia verifica-se a presença de retoque fotográfico. No caso destas espécies, ao contrário do que acontece com os ambrótipos, não é evidente a presença de contaminação microbiológica na frente das espécies fotográficas, sendo que, a estas ampliações, é apenas verificada no verso (Figura 3.37).

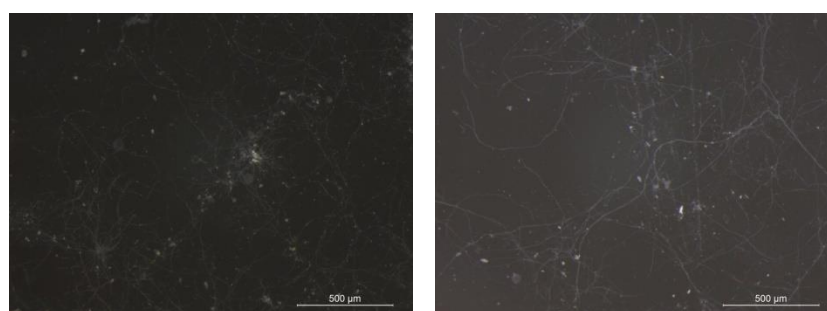
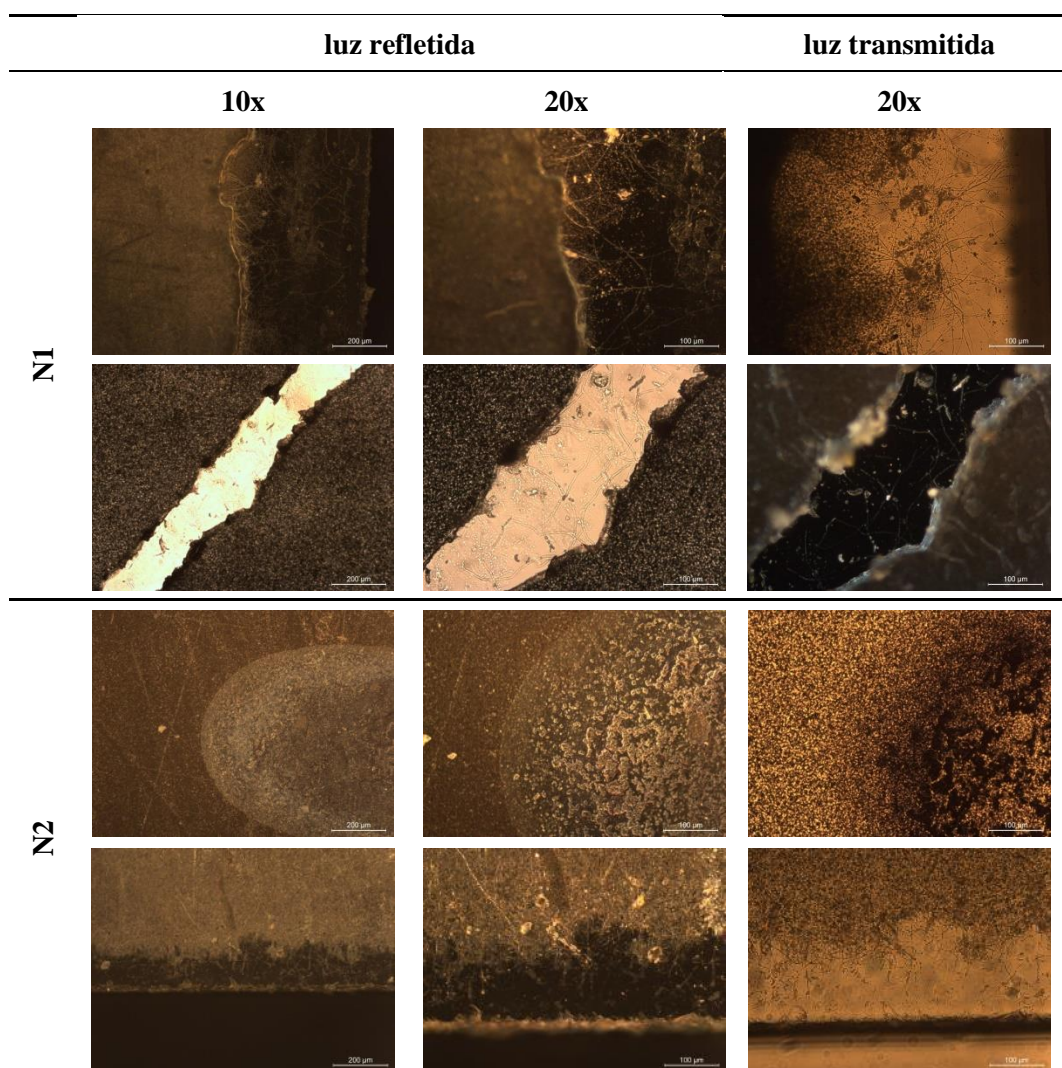


Figura 3.36. Imagens obtidas com microscópio estereoscópico evidenciando a presença de contaminação microbiológica no verso dos negativos N1 (esquerda) e N2 (direita). Ampliação: 63x.

Observaram-se fungos filamentosos sobre a superfície encontrando-se principalmente nas margens laterais dos negativos.

Através de um microscópio de campo escuro foram adquiridas imagens de áreas onde a superfície estava aparentemente degradada (Tabela 3.17). O destacamento de imagem nas margens laterais dos negativos e a presença de colonização microbiológica é evidenciado pelas imagens adquiridas.

Tabela 3.17. Imagens obtidas com microscópio de campo escuro de áreas degradadas das espécies de gelatina N1 e N2.



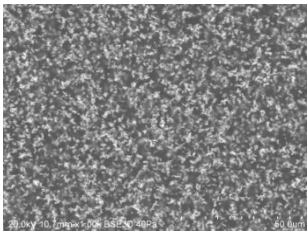
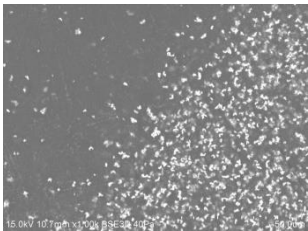
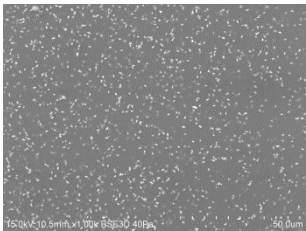
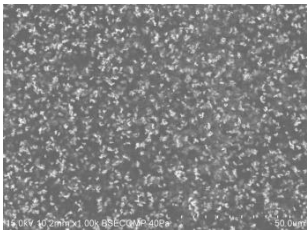
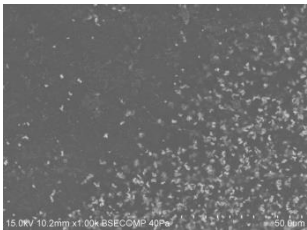
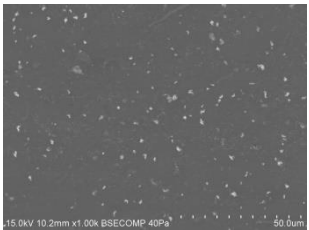
Nas margens laterais, particularmente nas áreas que evidenciam distribuição irregular da emulsão fotográfica, é mais facilmente detetada a presença de microrganismos com recurso a luz transmitida. Estes apresentam filamentos que se distribuem a partir de um centro com uma forma arredondada. É evidente a penetração destes filamentos na emulsão fotográfica. São ainda observáveis lacunas no negativo N1 e alterações cromáticas no N2 com aglomeração de um composto que poderá ser verniz ou resina.

3.3.3. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)

Tal como para os ambrótipos, foram realizadas análises de MEV-EDS a fim de avaliar a morfologia e a composição elementar dos negativos de gelatina em estudo.

Ao contrário do que acontece com os primeiros, não é possível determinar a dimensão das partículas formadoras de imagem pois esta é bastante reduzida e para além disso encontram-se em aglomerados, o que impossibilita a sua distinção individual. Valverde (2005) afirma que as partículas de prata metálica dos negativos de gelatina são relativamente grandes quando comparadas com as dos ambrótipos mas neste caso verifica-se precisamente o contrário pois as partículas dos ambrótipos em estudo apresentam dimensões superiores. No que diz respeito às densidades e em semelhança aos ambrótipos, existem alterações relativamente à concentração de partículas e à distribuição espacial das mesmas entre áreas de altas e baixas luzes e de interface entre estas (Tabela 3.18).

Tabela 3.18. Imagens de MEV representativas das diferentes densidades das partículas formadoras de imagem nas áreas de altas luzes, de baixas luzes e interface entre ambas, das amostras N1 e N2.

	área de altas luzes	interface	área de baixas luzes
N1			
N2			

A prata foi identificada como sendo o elemento constituinte maioritário das partículas formadoras de imagem em ambas as amostras (N1 e N2) como demonstra a figura 3.37.

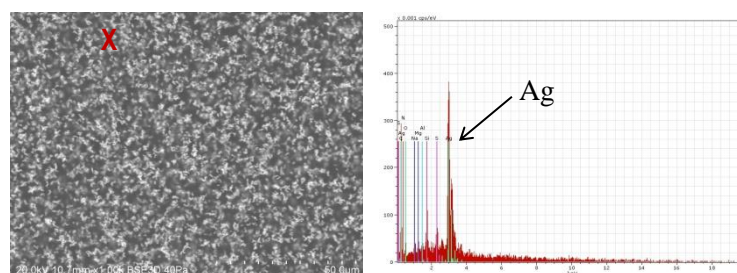


Figura 3.37. Imagens de MEV de uma área de altas luzes da amostra N1 e respetiva análise pontual elementar por EDS.

Apesar do estado de conservação razoável que apresentavam os negativos de gelatina, as imagens obtidas por MEV apresentam sinais de degradação. Na figura 3.38 e 3.39 apresentam-se algumas imagens representativas de degradações superficiais em ambos os negativos. Na superfície de N1 é possível observar degradações distintas, tais como, a existência de fraturas no vidro de suporte, distribuição irregular e destacamento da emulsão fotográfica bem como a presença de depósitos de partículas.

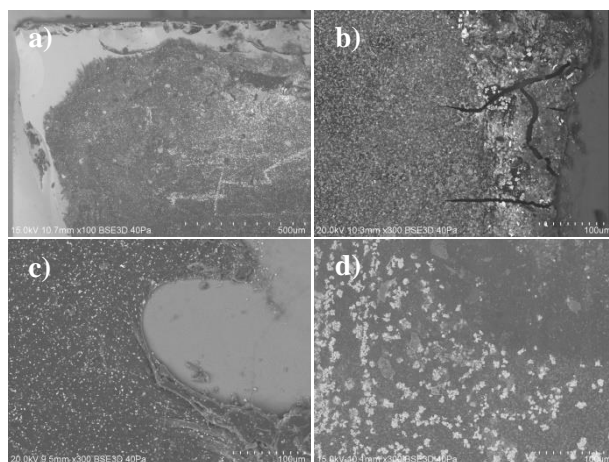


Figura 3.38. Imagens de MEV que apresentam algumas degradações presentes na superfície do negativo N1: a) fraturas do vidro de suporte e depósitos de sujidades; b, c) fissuras e destacamento da emulsão fotográfica; d) depósitos e aglomeração de partículas.

No que diz respeito ao negativo N2, algumas degradações semelhantes a N1 foram detetadas como as fraturas no vidro de suporte e partículas de sujidades. São também observáveis destacamentos junto às margens laterais. Manchas superficiais foram facilmente detetadas e estão provavelmente associadas ao processo de degradação espelho de prata. A figura 3.39 mostra a presença das degradações referidas.

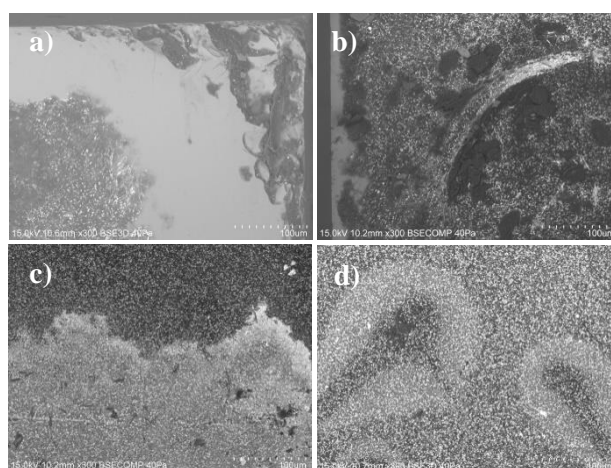


Figura 3.39. Imagens de MEV que apresentam algumas degradações presentes na superfície do negativo N2: a) fraturas do vidro de suporte e depósitos de sujidades; b) presença de aglomerados e destacamento da emulsão fotográfica; c, d) manchas superficiais (espelho de prata).

Na figura 3.40 encontram-se assinaladas algumas das áreas analisadas por MEV-EDS no negativo N1.



Figura 3.40. Áreas seleccionadas para análises por MEV-EDS da amostra N1.

As análises pontuais elementares realizadas ao ponto 1 permitiram caracterizar a composição química elementar do vidro de suporte bem como da emulsão fotográfica que se encontra sobre este. Elementos como o silício, sódio e cálcio foram detetados na superfície em que se verifica ausência da emulsão fotográfica (Fig. 3.40a) e indicam que a composição do vidro, neste caso, é provavelmente um vidro de silicato soda-cálcico, comumente designado de soda-cal (Gratuze & Janssens, 2004). Este resultado é semelhante ao obtido para os ambrótipos que também apresentam este tipo de composição nos vidros de suporte.

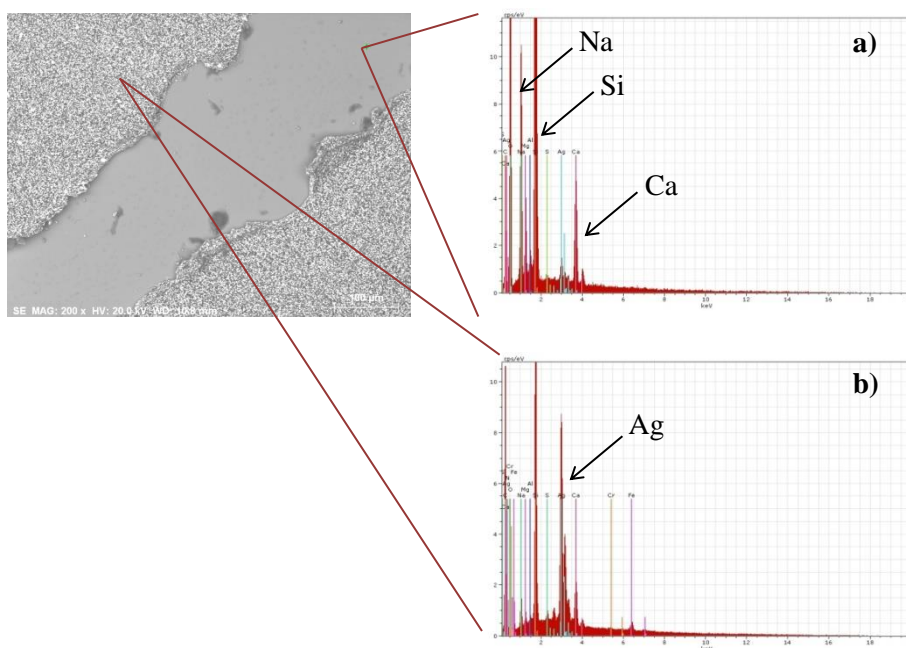


Figura 3.41. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS do ponto 1: **a)** área sem emulsão fotográfica; **b)** área com emulsão fotográfica.

No que diz respeito à análise realizada sobre a emulsão fotográfica, uma área de altas luzes, verifica-se a presença de prata, elemento constituinte das partículas formadoras de imagem (Fig. 3.41b).

O ponto 2 de análise diz respeito a uma área que apresenta manchas na superfície que se assemelham à presença de espelho de prata. A análise encontra-se representada na figura 3.42.

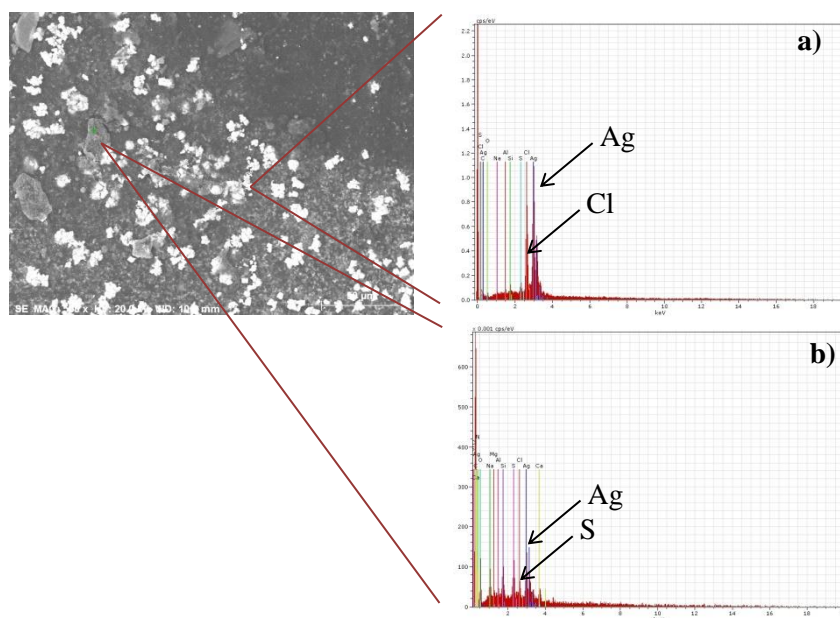


Figura 3.42. Imagem de MEV e respectivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 2 onde se verifica a presença de prata e cloro (a) e prata e enxofre (b).

A partir das imagens de MEV da área analisada verifica-se a presença de partículas (de dimensões superiores às partículas de prata metálica) dispersas sobre a superfície que apresentam uma composição elementar de prata e cloro (Fig. 3.42a). Tal como já foi referido, a presença de cloro pode ter inúmeras proveniências, contudo, e neste caso, sublinham-se os processos de degradação que envolvem a reação da prata metálica com o cloro gasoso. Aquando da elaboração da emulsão fotográfica, o metal de transição utilizado para formar os sais de prata fotossensíveis pode ter sido cloro e neste caso formar-se-ia cloreto de prata mas neste caso descarta-se essa hipótese pois caso fosse, o cloro estaria distribuído por toda a superfície, homogeneamente e não é o que se verifica neste caso. De qualquer forma, o cloro era um elemento menos utilizado (na produção de espécies) quando comparado ao bromo e ao iodo mas no entanto não deixa de ser referenciado por alguns autores (Valverde, 2005; Weaver, 2005). A partir das análises EDS foi também detetada a presença de enxofre (Fig. 3.42b). Este elemento encontrava-se associado à prata, pode ser indicativo da presença de sulfureto de prata (Ag_2S), composto conhecido como uma possível consequência da reação da prata metálica com o enxofre atmosférico ou compostos de enxofre presentes na própria espécie fotográfica, potencial desencadeador das manchas superficiais que N1 apresenta (espelho de prata). Contudo, segundo Di Pietro (2007) afirma que a presença de enxofre não é suficiente para concluir acerca da existência de espelho de prata e acrescenta ainda que os compostos de enxofre podem ter origem na proteína cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$) que faz parte da constituição da gelatina ou ainda na remoção incompleta de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) utilizado como agente fixador.

Por último foi analisada a área identificada no ponto 3. Esta área foi selecionada por representar uma interface entre a emulsão fotográfica e o vidro de suporte e nela se ter verificado a

presença de contaminação microbiológica por fungos filamentosos. A figura 3.43 permite verificar a presença de colonização microbiológica na superfície do negativo N1.

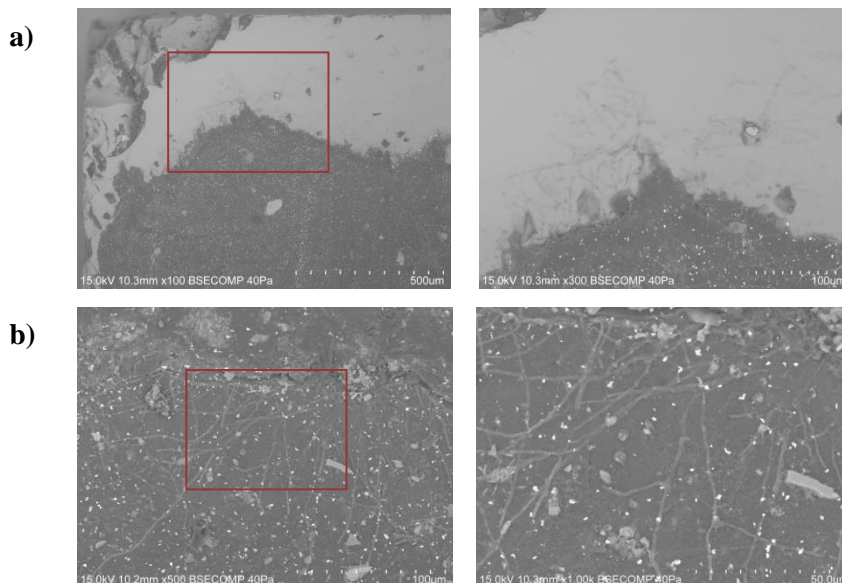


Figura 3.43. Imagens de MEV que evidenciam a presença de contaminação microbiológica na superfície do negativo N1. a) área de interface entre emulsão fotográfica e vidro de suporte evidenciando a presença de microrganismos; b) emulsão fotográfica colonizada por microrganismos.

A colonização microbiológica verifica-se principalmente nas margens do negativo, na interface entre a emulsão fotográfica e o vidro de suporte. No centro do negativo a presença microbiana é quase nula. As hifas que se observam parecem ter penetrado para camadas interiores constituintes do negativo, sendo esta uma das capacidades mais danosas para as espécies fotográficas porque pode danificar a emulsão fotográfica e consequentemente a imagem (Abrusci *et al.*, 2006; Zyska *et al.*, 1998). A proliferação de fungos filamentosos é indicativa da capacidade que os mesmos têm em utilizar a matriz fotográfica como substrato para o seu crescimento e desenvolvimento. Desta forma confirma-se a capacidade colonização de microrganismos nos negativos de gelatina causada por fungos filamentosos, fator que é indicativo de uma possível consequência de biodegradação/biodeterioração.

O negativo N2 foi também analisado por MEV-EDS e as áreas submetidas a análise encontram-se assinaladas na figura 3.44.



Figura 3.44. Áreas seleccionadas para análises por MEV-EDS da amostra N2.

As análises EDS realizadas no ponto 1 permitiram detetar elementos como a prata, enxofre, silício, sódio e cálcio (Fig. 3.45).

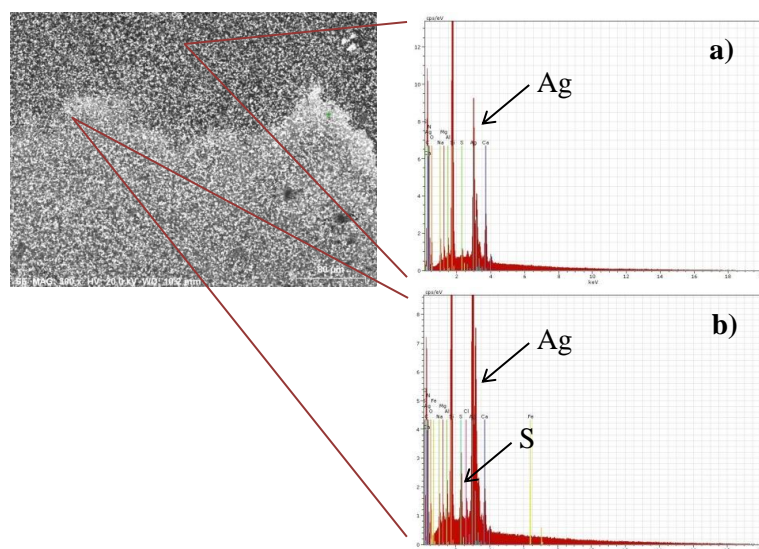


Figura 3.45. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 1 verificando-se a presença de prata (a) e prata e enxofre (b).

Os elementos prata e enxofre estão relacionados com a presença de sulfureto de prata (Ag_2S) na superfície da espécie fotográfica, composto já referenciado anteriormente como principal fator desencadeador de manchas na superfície. Foi também detetada a presença de silício, sódio e cálcio, que permite constatar que os vidros de suporte de N1 e N2 têm uma composição semelhante (vidro silicato soda-cálcico).

Relativamente ao ponto 2, foram realizadas análises em partículas distintas que permitiram verificar a presença de cloro sob a superfície da espécie fotográfica. Na figura 3.46 apresenta-se uma imagem de MEV e respetivas análises.

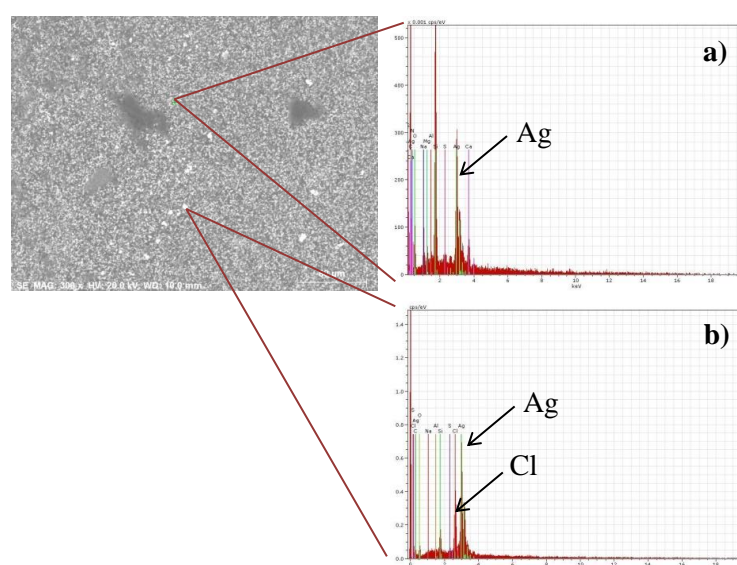


Figura 3.46. Imagem de MEV e respetivas análises pontuais elementares por EDS a duas partículas distintas no ponto 2 que apresenta a ausência (a) e presença de cloro (b).

As partículas de cloro distinguem-se das restantes pela sua forma pouco definida e dimensões superiores. Neblet (1962) refere que apesar dos cristais de cloreto de prata apresentarem uma estrutura cúbica, os cristais de prata variam consideravelmente desde formas triangulares a hexagonais, formas semelhantes a agulhas ou quase esféricas. Como a presença de cloro apresenta uma distribuição mais pronunciada nas margens do que no centro da espécie fotográfica, coloca-se uma questão que já foi referida anteriormente relativa à proveniência de cloro. Tendo em conta que o elemento foi detetado nos dois negativos, sempre com uma distribuição localizada, não é possível indicar que os sais de prata utilizados para formar a imagem possam ter sido cloretos de prata, contudo, sublinha-se ainda que Neblet (1962) apenas refere a utilização de cloretos de prata como material formador de imagem para os negativos de gelatina em suporte de papel (impressões de gelatina). A segunda hipótese mais pertinente para a presença de cloro é o facto de os negativos poderem ter estado expostos a contaminantes ou poluentes com cloro na sua composição. Centeno e colaboradores (2011) referem num estudo sobre deteriorações em daguerreótipos que AgCl e Ag_2S são os produtos de corrosão mais frequentemente identificados em objetos de prata expostos ao ambiente atmosférico e acrescentam ainda que AgCl pode ser formado através da reação da prata elementar com cloro gasoso.

A presença de microrganismos e sinais de degradações possivelmente causadas por estes foram também estudadas na amostra N2. O ponto 3 da figura 3.44 representa uma área onde se verificou contaminação microbiológica. No limite da margem lateral direita do negativo, numa área de interface entre a emulsão fotográfica e o vidro de suporte detetaram-se o que aparentam ser hifas e estruturas reprodutoras. A presença de microrganismos não era tão marcada como se verificou nos ambrótipos nem tão amplamente distribuída. Observaram-se fungos filamentosos apenas nas margens do negativo e a discriminação destes não é fácil devido à penetração para camadas interiores. Na figura 3.47 é possível observar hifas em diferentes planos ou seja, na superfície da emulsão fotográfica e sob esta, sendo que visualmente, parecem prolongar-se até ao vidro de suporte.

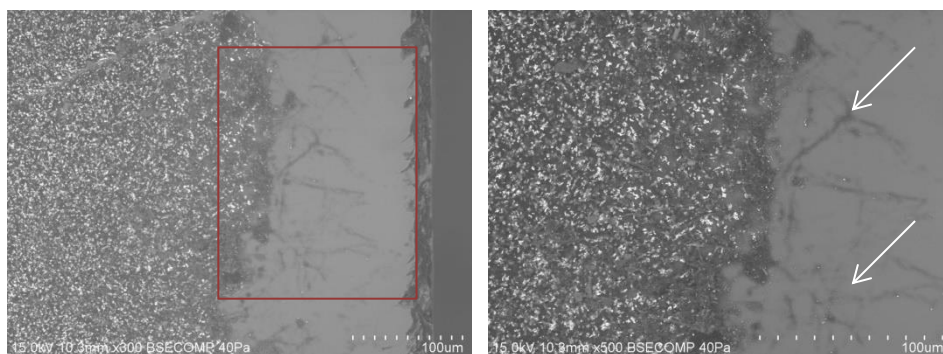


Figura 3.47. Imagens de MEV que evidenciam a presença de microrganismos na superfície da amostra N2.

As análises EDS não permitem tirar conclusões e afirmar se estamos perante a presença de microrganismos ou não, mas a presença dominante de carbono nas estruturas que aparentam ser hifas sobre o vidro de suporte aponta para essa conclusão (Fig. 3.48). Como a análise é feita na interface entre a emulsão fotográfica e o vidro de suporte, é possível verificar que na área a que se restringe a ausência de emulsão fotográfica, ou seja, onde apenas se verifica vidro, que as estruturas filamentosas são essencialmente constituídas por carbono.

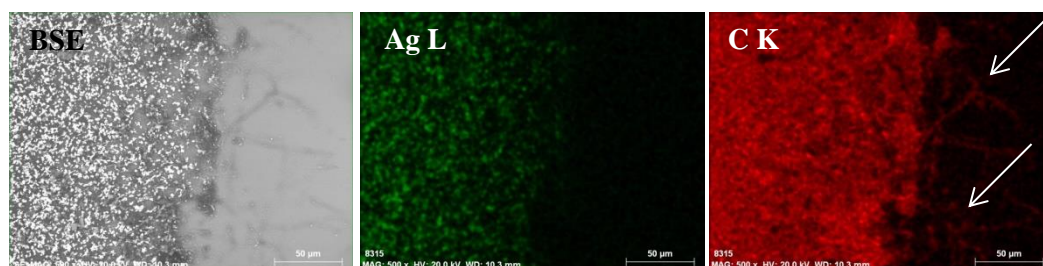


Figura 3.48. Mapas de distribuição elemental EDS de uma área aparentemente colonizada do negativo N2.

Como se verifica na figura acima, para além de prata que está associada às partículas formadoras de imagem, a presença dominante de carbono está relacionada com a matriz fotográfica (gelatina) mas na área de ausência de emulsão, as estruturas que aparentam ser hifas são essencialmente constituídas por este elemento o que leva a crer que se trata de uma contaminação microbiológica.

3.3.4. Micro-espectroscopia de infravermelho (μ -FT-IR)

Ambos os negativos de gelatina foram estudados por μ -FT-IR em modo de reflexão total atenuada (ATR) para determinar a composição química dos materiais que os constituem e para discriminar possíveis degradações, e para isso foram analisadas áreas degradadas e não degradadas. Os espectros obtidos foram normalizados e comparados com a base de dados que acompanha o software do equipamento e ainda pelo IRUG (base de dados online).

Na figura 3.49 apresentam-se dois espectros obtidos a partir da análise a duas áreas distintas da superfície do negativo N1, uma visivelmente degradada no canto superior esquerdo onde se verifica a presença de manchas superficiais e uma área visivelmente não degradada no canto inferior direito.

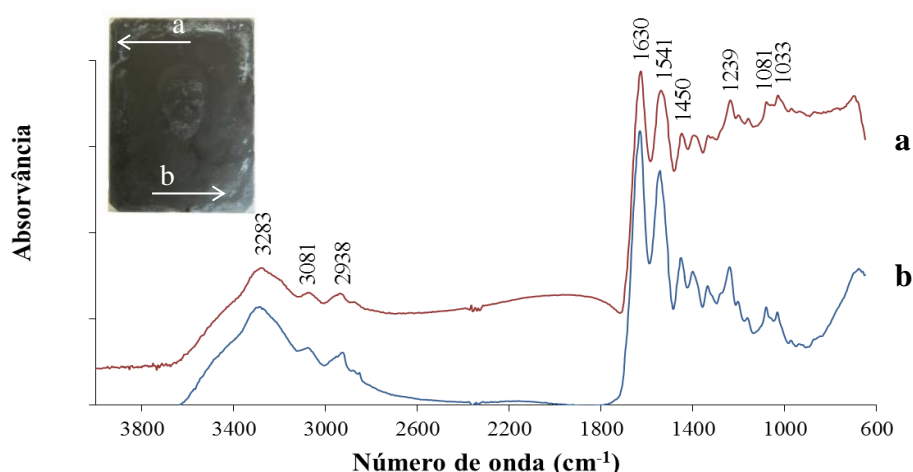


Figura 3.49. Espectro de μ -FT-IR de uma área degradada (a) e outra área visivelmente não degradada (b) do negativo N1.

No espectro obtido (fig. 3.49) verifica-se a presença da banda a 3283 cm^{-1} que diz respeito ao estiramento da ligação N-H e 3081 cm^{-1} e 2938 cm^{-1} que são relativos ao estiramento de CH. A presença de material proteico é evidenciada pelas bandas 1630 cm^{-1} , 1541 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} que correspondem ao estiramento e deformação, das ligações CN e NH da amida I, II e III, respetivamente (Almeida *et al.*, 2012). Quando comparados estes resultados ao espectro referência da gelatina (Fig. II.4 do anexo II) é possível verificar que a camada de emulsão fotográfica é constituída por gelatina. Estes resultados vão de encontro aos que se obtiveram por MEV-EDS. Relativamente à comparação entre a área não degradada e degradada não se obtiveram resultados conclusivos. Os espectros obtidos são bastante semelhantes, não apresentam bandas que os diferenciem e a única alteração observável é a inversão de intensidades entre as bandas 1081 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} que no caso da área visivelmente não degradada a primeira é mais intensa ao contrário do que acontece no espectro da área não degradada. Estas bandas dizem respeito ao estiramento C-O e não estão diretamente relacionados com as degradações químicas da gelatina. Foram realizadas análises à face (representada na imagem fotográfica), onde é evidente a presença de retoque fotográfico, para tentar determinar qual a composição dos materiais utilizados para o efeito, mas as mesmas não foram conclusivas. Os resultados foram semelhantes aos adquiridos numa área visivelmente não degradada na ausência de retoque fotográfico (a presença de gelatina influenciou o resultado).

Os espectros de μ -FT-IR permitem verificar a presença de material orgânico, a gelatina, utilizada como emulsão fotográfica. As análises realizadas para identificar produtos de degradação não foram conclusivas pois o espectro da gelatina acaba por mascarar outros resultados impedindo a determinação da composição de outros materiais. Foi ainda realizada uma análise no verso do negativo (onde não existe emulsão fotográfica) para determinar a composição do vidro de suporte. Na figura 3.50 apresenta-se o espectro obtido.

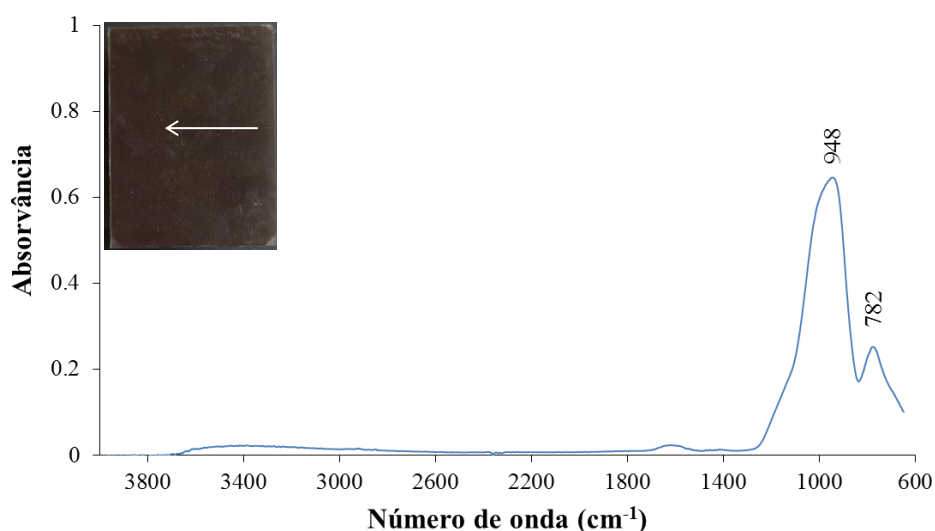


Figura 3.50. Espectro de μ -FT-IR de uma área no verso de N1.

A observação do espectro resultante evidencia a presença de uma banda dominante aos 948 cm^{-1} que diz respeito ao estiramento da ligação Si-O e uma segunda banda de intensidade inferior aos 782 cm^{-1} relativa ao estiramento da ligação Si-O-Si (El-Batal *et al.*, 2010; Lee, Y-K. *et al.*, 1997), resultados que nos permitem concluir que o vidro de suporte tem uma constituição base-SiO₂.

Relativamente a N2 foi executado o mesmo procedimento para confirmar a composição da emulsão fotográfica e para verificar a presença de produtos de degradação. As análises foram realizadas em áreas visivelmente não degradadas, degradadas e por fim em áreas alteradas por retoque fotográfico. Na figura 3.51 apresentam-se espectros de FT-IR que apresentam resultados semelhantes aos obtidos para N1 relativamente à emulsão fotográfica e ao vidro de suporte. Tendo em conta que estas espécies pertencem à mesma coleção fotográfica seria de esperar que não se encontrassem diferenças relevantes entre os materiais que fazem parte da sua composição.

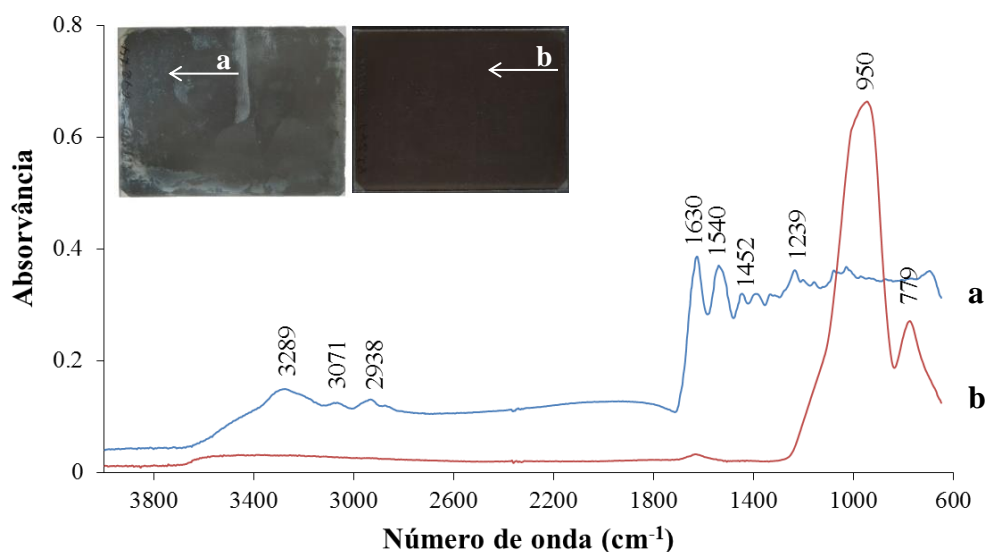


Figura 3.51. Espectros de μ -FT-IR de uma área de emulsão fotográfica (a) e sem emulsão fotográfica (b) da amostra N2.

O espectro de μ -FT-IR, figura 3.51a é resultado da análise da emulsão fotográfica e tal como em N1 revela que a composição química da mesma é gelatina. Esta afirmação é suportada pela presença das bandas características deste material, $3400\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, 1630 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} , 1452 cm^{-1} (Casoli *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2012). A figura 3.51b representa o espectro obtido de uma análise no verso do negativo, ou seja, numa área com ausência de emulsão fotográfica. A composição do vidro é semelhante à da amostra N1 (vidro de silicato soda-cálcico). Tal como na amostra N2, análises realizadas na superfície que apresenta retoque fotográfico não evidenciaram nenhuma diferença relativamente ao espectro da gelatina, que pode estar a mascarar os resultados pretendidos. A figura 3.52 apresenta um espectro de μ -FT-IR adquirido numa área visivelmente não degradada.

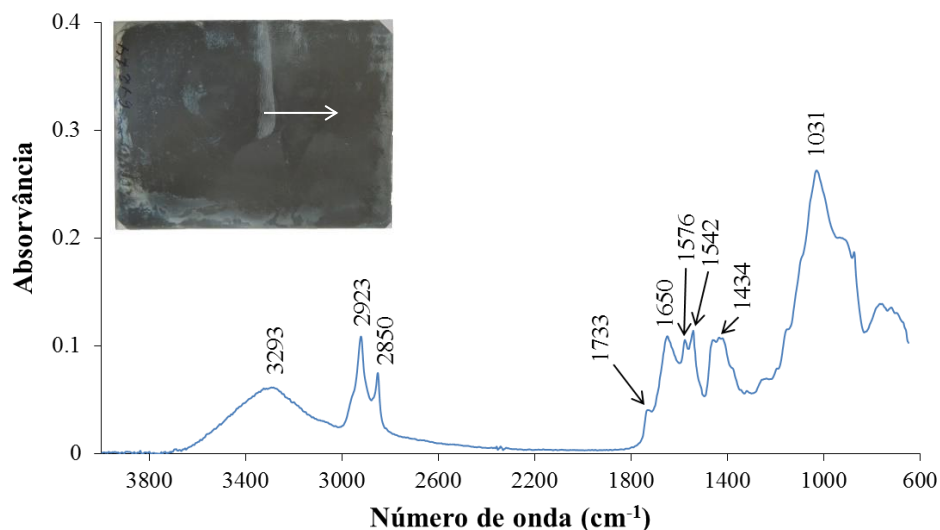


Figura 3.52. Espectro de μ -FTIR de uma área visivelmente não degradada da amostra N2.

O resultado obtido não vai de encontro ao esperado. Ao contrário dos anteriores, este espectro apresenta as bandas do grupo carbonilo, mais especificamente, do estiramento simétrico de CH_2 aos 2923 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , aos 1733 cm^{-1} ocorre o estiramento simétrica da ligação C=O e aos 1031 cm^{-1} a distensão a ligação (C-O). Estas bandas, associadas também à banda de absorção $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (distensão da ligação C=C) podem ser indicativas da presença de uma resina de classe indeterminada (Azémard *et al.*, 2014; Bruni & Guglielmi, 2014). Dificilmente se afirma uma presença marcada de material proteico com base neste espectro portanto considera-se que não se encontra mascarado pela emulsão fotográfica. Este resultado poderia ser relativo à presença de retoque fotográfico mas na área onde foi realizada a análise não apresentava retoque e tanto quando se sabe, não eram utilizadas resinas para realizar o retoque fotográfico, a função destas era essencialmente de revestimento para proteção das espécies de degradações e garantir que estes se mantivessem inalterados ao longo do tempo. Albright (1997) refere a utilização de resinas aquando de intervenções de restauro, mas segundo a informação que existe acerca destes negativos de gelatina consta que nunca foram submetidos a qualquer intervenção, o que afasta essa hipótese.

3.4. Caracterização microbiológica de negativos de gelatina

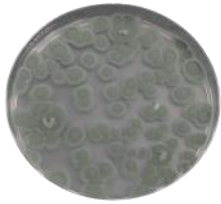
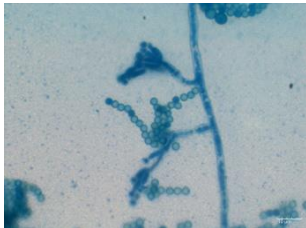


3.4.1. Isolamento e identificação de espécies microbianas

A degradação destas espécies fotográficas por microrganismos é referenciada por vários autores e no que diz respeito a fungos, os géneros mais frequentemente isolados em matriz de gelatina são *Penicillium* e *Aspergillus* (Abrusci *et al.*, 2009; Lourenço & Sampaio, 2007; Zyska *et al.*, 1988) mas outros fungos são também associados a estas espécies, tais como, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Microascus*, *Phoma* entre outros (Vivar *et al.*, 2013; Abrusci *et al.*, 2005). Em relação a isolados bacterianos Abrusci e colaboradores (2009, 2006 e 2004) relatam que as principais estirpes isoladas em películas cinematográficas com emulsão de gelatina e em negativos de gelatina são do género *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Tal como se procedeu para os ambrótipos, foi realizado o isolamento de microrganismos nos negativos de gelatina. Relativamente a estes últimos, encontravam-se visivelmente menos degradados e não era notória a presença de colonização microbiológica aquando a sua observação a olho nu. A recolha microbiológica foi efetuada em áreas distintas na frente e verso de ambos os negativos (cf. 2.3.3.2. na seção da metodologia).




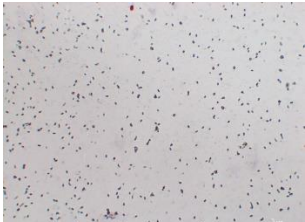
No que diz respeito ao negativo N1 foram isolados duas estirpes fúngicas distintas e duas bacterianas. A partir da observação das estruturas reprodutoras foi possível classificar ao género alguns dos isolados fúngicos (Tabela 3.19)

Tabela 3.19. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra N1.

N1			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
N _{1_1_1}			<i>Penicillium</i> sp.1
N _{1_2_1}			Micélio

No caso do negativo N1, as estirpes fúngicas isoladas correspondem a uma de *Penicillium* sp.1 e a um Micélio não identificado. No que diz respeito à presença de isolados bacterianos, foram identificadas estirpes do género *Bacillus* (N_{1_1_5}) e cocos (N_{1_3_5}) Gram negativos (Tabela 3.20).

Tabela 3.20. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra N1 e respetiva identificação.

N1		
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico
N _{1_1_5}		
N _{1_3_5}		

Em relação ao negativo N2, as estirpes fúngicas isoladas correspondem a estirpes do género *Penicillium*. (Tabela 3.21). O género *Penicillium* não é apenas o colonizador mais frequente nos ambrótipos mas também nos negativos de gelatina.

Tabela 3.21. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra N2.

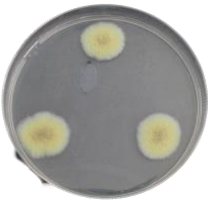
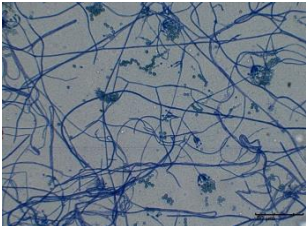

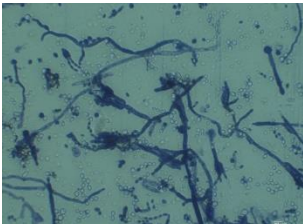
N2			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
N _{2_2_1}			<i>Penicillium</i> sp.2

Tabela 3.21. Continuação. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas isoladas na amostra N2.

N2			
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico	designação
N _{2_2_2}			<i>Penicillium</i> sp.3

Na Tabela 3.22 encontra-se a caracterização das estirpes isoladas. Das sete estirpes bacterianas isoladas, seis eram estirpes de cocos, duas Gram positivas (N_{2_1_3}, N_{2_4_4_1}) e três Gram negativas (N_{2_3_3}, N_{2_3_4}, N_{2_3_5}). As restantes duas, bacilos Gram negativos (N_{2_1_4}, N_{2_4_4}).

Tabela 3.22. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra N2.


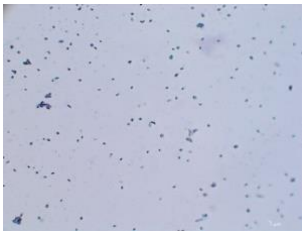

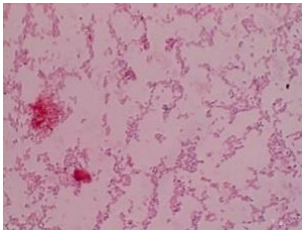

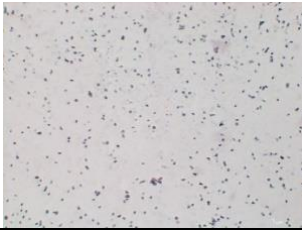

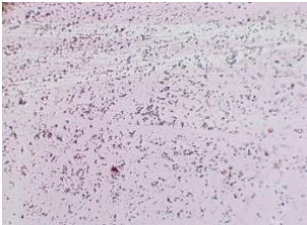

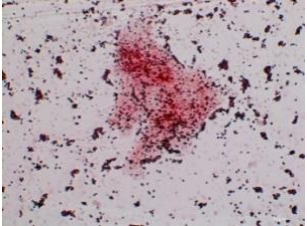

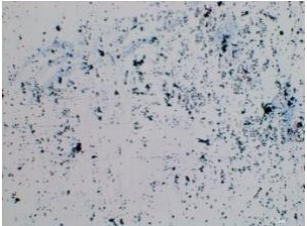

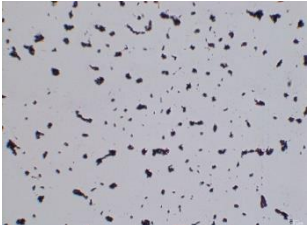
N2		
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico
N _{2_1_3}		
N _{2_1_4}		
N _{2_3_3}		

Tabela 3.22. Continuação. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes bacterianas isoladas na amostra N2 e respetiva identificação.

N2		
denominação	aspeto macroscópico	aspeto microscópico
N _{2_3_4}		
N _{2_3_5}		
N _{2_4_4_1}		
N _{2_4_4_2}		

Segundo Vivar e colaboradores (2013), a gelatina é um material altamente suscetível e facilmente atacado por microrganismos devido à sua constituição. Alguns fungos são altamente eficientes a quebrar a estrutura da gelatina visto que têm capacidade de provocar a hidrólise de cadeias através da produção de gelatinases e mesmo na presença de sais de prata e outros compostos tóxicos não se verifica inibição total de crescimento microbiológico (Vivar *et al.* 2013).

Tendo em conta os resultados obtidos, parece que estas espécies fotográficas estiveram submetidas a condições de armazenamento inapropriadas que proporcionaram o desenvolvimento microbiano e que este poderá continuar a propagar-se pela superfície (do verso e frente) das espécies em estudo. O isolamento de poucas estirpes fúngicas pode estar relacionado com uma possível utilização de uma solução de formaldeído (CH₂O), antifúngico que era utilizado durante a produção de negativos de gelatina (Lourenço & Sampaio, 2009).

3.4.2. Avaliação do potencial biodeteriogénio dos isolados bacterianos

No sentido de tentar avaliar o efeito da presença de contaminação bacteriana nos negativos de gelatina, foi realizado um ensaio de simulação para verificar a capacidade destes isolados em utilizar esta matriz como substrato e quais os efeitos resultantes desse mesmo processo. Para este ensaio selecionaram-se 4 estirpes distintas de bactérias isoladas a partir dos negativos de gelatina históricos (N2_4_4_1; N2_3_3; N2_3_4; N1_1_5). Efetuaram-se culturas frescas destas bactérias as quais foram inoculadas nos negativos de gelatina contemporâneos (cf. 2.3.3.8. da Metodologia). A inoculação foi feita segundo o esquema que se encontra na figura 3.53.

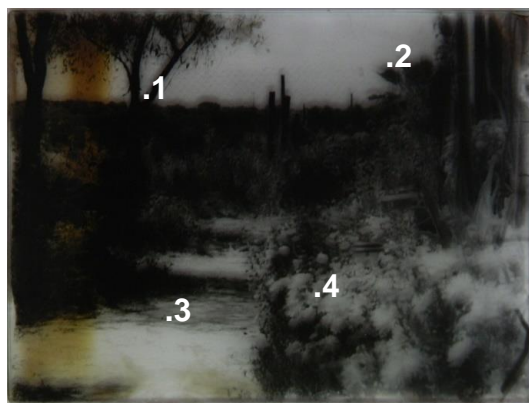


Figura 3.53. Áreas selecionadas para indução de contaminação e respectivos isolados bacterianos inoculados: 1) N2_4_4_1; 2) N1_1_5; 3) N2_3_3; 4) N2_3_4.

Para avaliar a ação dos microrganismos, os negativos contemporâneos utilizados foram caracterizados por microscopia ótica e MEV-EDS antes do início do ensaio (dia zero), ao fim de sete dias e novamente ao décimo quinto dia aquando término do mesmo.

Na tabela 3.23 apresentam-se as imagens de microscopia ótica que foram adquiridas aquando o início do ensaio (t0) e têm como principal objetivo, para além da caracterização morfológica do negativo em estudo, elucidar sobre o estado de conservação do mesmo para posterior comparação com os resultados do sétimo e décimo quinto dia.

Tabela 3.23. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo obtidas com microscópio estereoscópico no t0 do ensaio de simulação.









áreas de análise	ampliações	
	7.8x	20x
1		

Tabela 3.23. Continuação. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo obtidas com microscópio estereoscópico no t0 do ensaio de simulação.

áreas de análise	ampliações	
	7.8x	20x
2		
3		
4		

A partir das imagens obtidas a partir de microscópio estereoscópico verifica-se que o negativo apresentava algumas degradações possivelmente causadas durante o processo de fabrico do mesmo, tal como riscos e alguns destacamentos da emulsão. Sublinha-se a presença de amarelecimento na margem lateral esquerda que foi provavelmente originada pela exposição direta à luz aquando a etapa de sensibilização. À exceção destas patologias, a estrutura física não se mostrava comprometida e a imagem permite distinguir facilmente áreas de altas e baixas luzes. Note-se que as zonas selecionadas para a indução de contaminação contemplam ambas estas áreas pois existem alguns estudos que referem que o crescimento e desenvolvimento microbiano são influenciados pela presença (ou ausência) de sais de prata (Bingley & Verran, 2013; Lourenço & Sampaio, 2009). Na figura 3.54 apresentam-se imagens de MEV da superfície do negativo de gelatina que se consideram representativas e que permitem verificar mais detalhadamente a estrutura do mesmo evidenciando a ausência de alterações físicas e morfológicas.

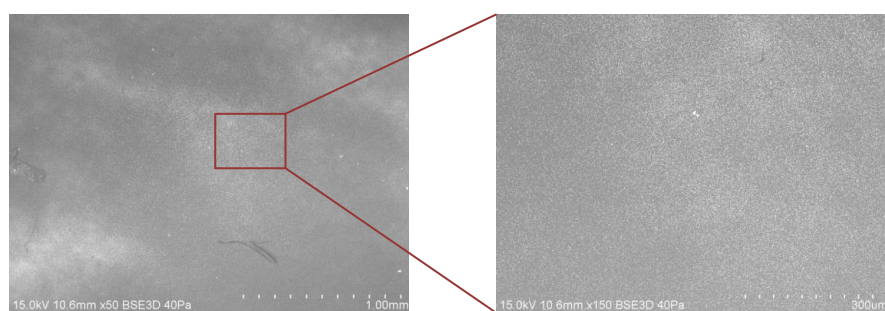



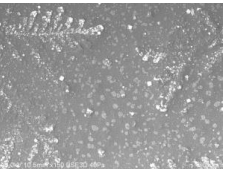
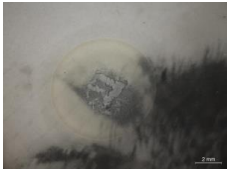
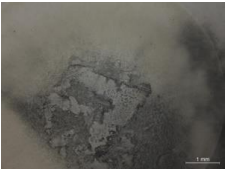

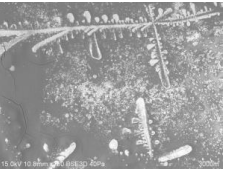

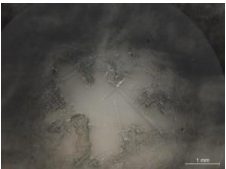
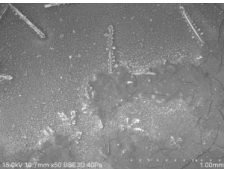
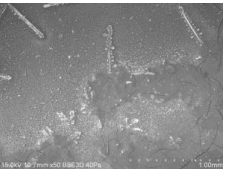




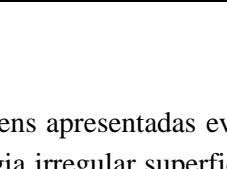
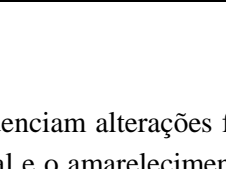
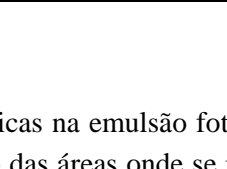
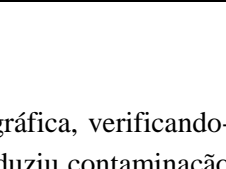
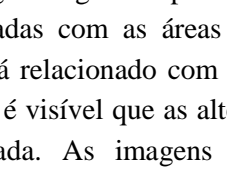
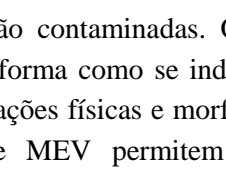
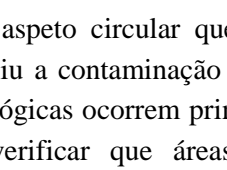
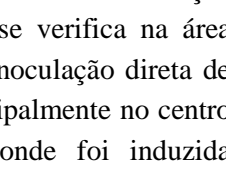
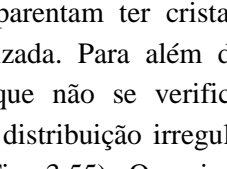
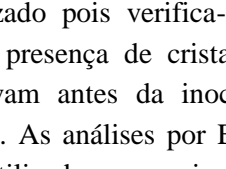
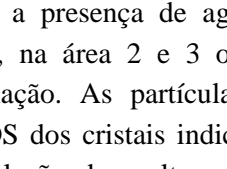
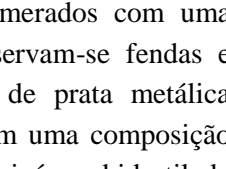
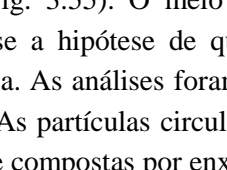
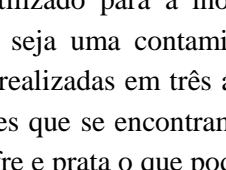
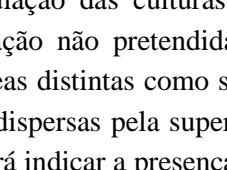
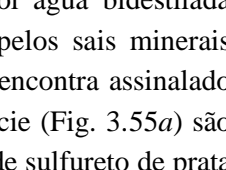


Figura 3.54. Imagens de MEV da superfície do negativo de gelatina contemporâneo que evidenciam a matriz fotográfica sem alterações.

Na tabela 3.24 apresentam-se imagens de microscopia ótica e de MEV adquiridas no sétimo dia de ensaio (t7), ou seja, sete dias após a indução de contaminação.

Tabela 3.24. Imagens da superfície do negativo de gelatina contemporâneo adquiridas com microscópio estereoscópico e MEV no t7 do ensaio de simulação.

áreas de análise	microscópio estereoscópico		MEV	
	7.8x	20x	50x	150x
1				
				
2				
				
3				
				
4				
				

As imagens apresentadas evidenciam alterações físicas na emulsão fotográfica, verificando-se uma morfologia irregular superficial e o amarelecimento das áreas onde se induziu contaminação quando comparadas com as áreas não contaminadas. O aspeto circular que se verifica na área contaminada está relacionado com a forma como se induziu a contaminação (inoculação direta de cultura fresca) e é visível que as alterações físicas e morfológicas ocorrem principalmente no centro da área inoculada. As imagens de MEV permitem verificar que áreas onde foi induzida contaminação aparentam ter cristalizado pois verifica-se a presença de aglomerados com uma estrutura cristalizada. Para além da presença de cristais, na área 2 e 3 observam-se fendas e destacamentos que não se verificavam antes da inoculação. As partículas de prata metálica assumiram uma distribuição irregular. As análises por EDS dos cristais indicam uma composição não orgânica (Fig. 3.55). O meio utilizado para a inoculação das culturas foi água bidestilada portanto afasta-se a hipótese de que seja uma contaminação não pretendida pelos sais minerais presentes na água. As análises foram realizadas em três áreas distintas como se encontra assinalado na Figura 3.55. As partículas circulares que se encontram dispersas pela superfície (Fig. 3.55a) são maioritariamente compostas por enxofre e prata o que poderá indicar a presença de sulfureto de prata e para além destes elementos verifica-se também a presença de sódio e potássio. A Figura 3.55b representa a análise que foi feita aos aglomerados de partículas e evidencia a presença maioritária

dos elementos prata e cloro, bem como de enxofre mas em quantidades inferiores. A partir dos resultados aponta-se também para a possibilidade da existência de cloreto de prata. A área não alterada (Fig. 3.55c) apresenta, para além da componente orgânica (da gelatina) elementos como sódio, silício e cálcio que como já foi referido anteriormente, fazem parte da composição do vidro.

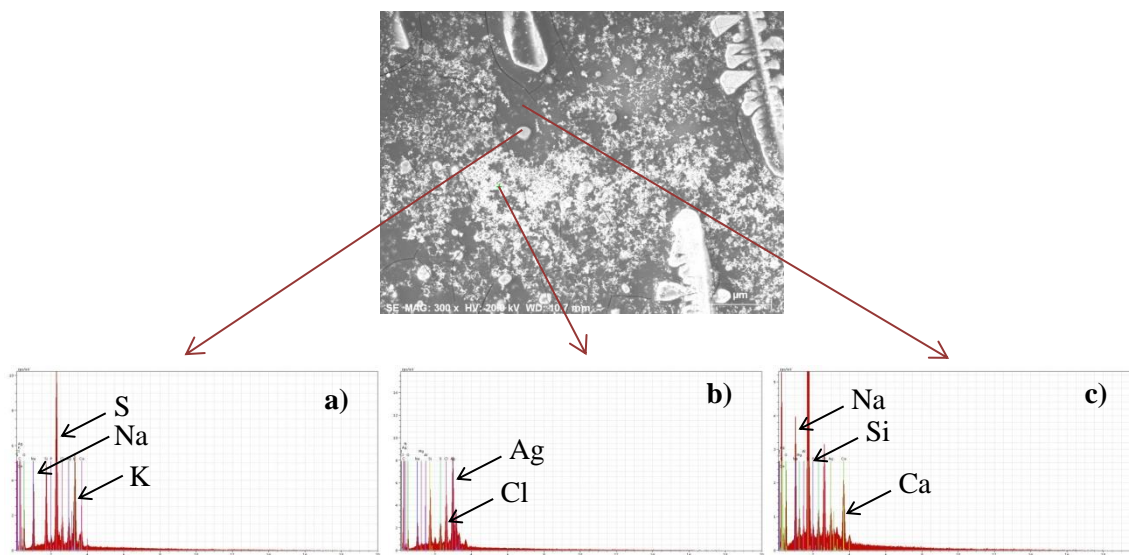

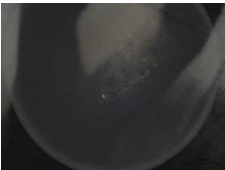

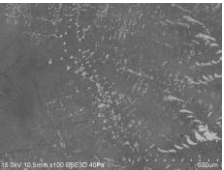
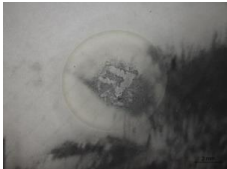
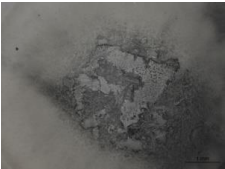
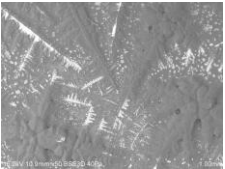
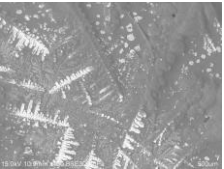

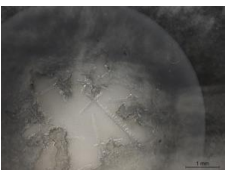
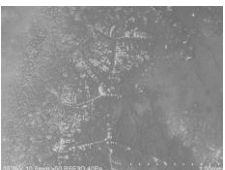
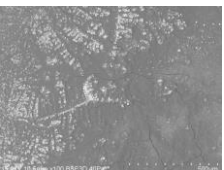

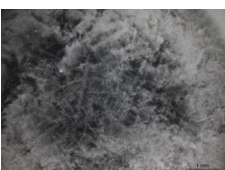




Figura 3.55. Análises pontuais elementares por EDS da superfície do negativo de gelatina contemporâneo no t7 do ensaio de simulação. a) partícula circular; b) aglomerados de partículas; c) área sem alteração.

Em suma, quando comparadas as imagens do t7 com as que foram adquiridas no t0 do ensaio são evidentes as alterações superficiais do negativo de gelatina. Tendo em conta as ampliações apresentadas não foi possível fazer a visualização dos microrganismos presentes, mas aquando a aquisição de imagens foram utilizadas ampliações bastante superiores que permitiram visualizar algumas colónias de bactérias. Algumas destas poderão ter migrado para camadas mais interiores, promovendo alterações. Ao décimo quinto dia (t15) as observações por MO e MEV foram repetidas (tabela 3.25) e não foram detetadas alterações significativas, relativamente às imagens obtidas no t7.

Tabela 3.25. Imagens de microscópio estereoscópico e MEV da superfície do negativo de gelatina contemporâneo no t15 do ensaio de simulação.

áreas de análise	microscópio estereoscópico		MEV	
	7.8x	20x	50x	150x
1				
2				
3				
4				

A superfície do negativo parece ter-se mantido inalterada do t7 para t15. As imagens de MEV também não indicam alterações muito pronunciadas.

As bactérias em estudo foram isoladas dos negativos de gelatina históricos, o que indica a sua capacidade de crescimento nesta matriz. Tendo em conta todos os resultados apresentados, as alterações de estrutura física e morfológica que se observaram, conclui-se que o inóculo pode ter gerado um aumento de viscosidade da matriz (gelatina) e com isto podem ter aparecido fendas e destacamentos, bem como pode ter ocorrido uma deslocação das partículas formadoras de imagem. A cristalização superficial pode ter tido origem na reação dos elementos constituintes do negativo com a solução inoculada. Verificou-se ainda que os destacamentos e fendas que surgiram provocaram uma migração de material biológico para camadas interiores, o que fez com que a sua deteção se torna-se mais difícil.

**COMENTÁRIOS FINAIS
E PERSPETIVAS FUTURAS**

Este estudo centrou-se na caracterização material e microbiológica de quatro espécies fotográficas, dois ambrótipos do séc. XIX e dois negativos de gelatina do séc. XX pertencentes a uma coleção privada e ao Arquivo Fotográfico da Câmara Municipal de Évora respetivamente.

As espécies fotográficas fazem parte do património gráfico da Humanidade e atualmente existe um interesse crescente no seu estudo por questões de valorização e salvaguarda. Estes itens apresentam padrões de degradação física – normalmente de fácil identificação e que resulta de manuseamento e armazenamento inadequado – química e microbiológica, de natureza bastante mais complexa. Assim, o estudo desenvolvido durante este trabalho tem uma grande pertinência e pretendeu dar um contributo para o conhecimento destes processos de produção, nomeadamente, a ambrotipia ainda muito pouco estudada, e respetivos padrões de degradação.

Na caracterização material das espécies foram utilizadas técnicas de análise não destrutivas tais como a fotografia técnica, a microscopia ótica, microscopia eletrónica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energias (MEV-EDS), a micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (μ -FT-IR), a micro-espectroscopia Raman (μ -Raman) e a micro-difração de raios-X (μ -DRX). Só a utilização combinada das técnicas mencionadas permitiu levar a cabo um estudo abrangente cujos resultados constituem uma contribuição para o conhecimento destas espécies fotográficas, dos seus processos de produção e das suas patologias.

A fotografia técnica e microscopia ótica foram a primeira abordagem, após a observação visual das peças, e que permitiram mapear alterações da superfície como manchas, destacamentos de imagem, presença de material biológico, entre outros. O recurso a estas técnicas permitiu ainda verificar que o vidro usado como suporte de um dos ambrótipos (A1) é um vidro *ruby*, ou seja, tem uma cor vermelha alaranjada (pela presença de Mn) que lhe confere o efeito de positivo sem que seja necessária a utilização de uma superfície opaca e escura no seu verso. MEV-EDS, em modo de pressão variável, permitiu analisar as amostras diretamente sem recurso a microamostragem, possibilitando o estudo morfológico comparativo de áreas degradadas e não degradadas. A prata (Ag) foi identificada como único constituinte das partículas formadoras de imagem, tendo-se verificado diferenças na dimensão das partículas entre os dois ambrótipos. As partículas apresentam dimensões superiores nas áreas de altas luzes em relação às áreas de baixas luzes, no ambrótipo A1, porém em A2 as dimensões das partículas são aproximadas entre as diferentes áreas. A menor dimensão das partículas formadoras de imagem no ambrótipo A2 (e, portanto, maior densidade de partículas em qualquer das regiões quando comparadas com o ambrótipo A1) sugere um maior controlo na precipitação e cristalização do nitrato de prata como material fotossensível e precursor das partículas formadoras de imagem. A observação por MEV permitiu ainda detetar a presença de material orgânico nas margens do ambrótipo A1 ao contrário do que aconteceu com A2, que foi posteriormente identificada por μ -FT-IR como uma resina triterpénica (possivelmente resina damar). A presença desta resina apenas nas margens levanta a hipótese de que tenha sido utilizada para ajudar a fixar o separador metálico. Em ambos os ambrótipos foram detetados produtos de degradação, visíveis a olho nu. O estudo por MEV permitiu mapear áreas comuns aos elementos Ag, S e Cl, sugerindo a presença de compostos como Ag_2S e AgCl . O μ -Raman deu um contributo importante na identificação destes compostos, pois utilizando padrões foi possível confirmar que nas regiões onde se identificou por MEV-EDS a presença concomitante de Ag e S ou de Ag e Cl, os compostos formados eram de facto Ag_2S ou AgCl . Para além deste, identificou-se um produto resultante da fotodecomposição de Ag_2S . No ambrótipo A1 foi ainda detetada presença de iodo, o que sugere a utilização de iodeto de prata como material fotossensível e evidencia uma lavagem ineficiente deste material. As análises por MEV-EDS localizaram este elemento numa região situada sem contacto com a luz natural, protegida com o separador metálico, o que impediu que o processo de revelação continuasse, como destruição parcial da imagem. Mas para além destas áreas, foi

também identificado em áreas mais centralizadas, ou seja, a presença deste elemento pode também ser apontada como material fotossensível que tenha sido utilizado aquando a produção da espécie fotográfica. No caso de A2 não foi possível determinar qual o material fotossensível utilizado na produção do mesmo. A μ -DRX permitiu obter neste caso um resultado particularmente interessante pois foi possível detetar AgI cristalino nos locais referenciados por MEV. O estudo por μ -FT-IR dos ambrótipos permitiu ainda concluir acerca da natureza da solução fotográfica, confirmando que se trata de nitrato de celulose com bandas típicas a 1660, 1280, 1200, 950 e 848 cm^{-1} .

No que diz respeito aos estudos de caracterização microbiológica dos ambrótipos A1 e A2 verificou-se que ambos se encontravam colonizadas por estirpes fúngicas e bacterianas. Em relação a A1 obtiveram-se sete isolados fúngicos, dos quais, cinco eram do género *Penicillium*, uma estirpe de *Ulocladium* sp. e um Micélio e ainda três isolados bacterianos. Em A2 foram isoladas três estirpes distintas de *Penicillium* sp. e relativamente a bactérias, quatro estirpes diferentes. Procedeu-se também à avaliação da capacidade de produção de enzimas celulolíticos dos fungos isolados em A1 e para termos de comparação incluiu-se neste estudo uma estirpe de *Trichoderma harzianum* (CCMI 783) com atividade celulolítica conhecida (controlo positivo). Nesta avaliação utilizou-se o meio Basal suplementado com carboximetilcelulose e recorreu-se à validação estatística dos resultados enzimáticos a partir da análise de variância (ANOVA) concluindo-se que existem diferenças significativas entre os isolados fúngicos ($p < 0.05$). Os isolados *Penicillium* sp.1 e 4, Micélio e *Ulocladium* sp.1 foram os que demonstraram atividades específicas mais elevadas, sendo o *Penicillium* sp.4 que apresentou atividade máxima com um valor de 0.63 U/mg. Verificou-se a partir desta avaliação que as estirpes fúngicas têm capacidade de produzir enzimas celulolíticos ou seja, os resultados são indicativos da capacidade destes microrganismos se desenvolverem numa matriz de celulose e podem desta forma apresentar uma ação biodeteriorígenica nos ambrótipos em estudo.

O fungo que apresentou atividade específica máxima foi selecionado para a realização de ensaio de simulação que se subdividiu num ensaio em meio líquido e outro em meio sólido e que teve como principal objetivo verificar a capacidade de crescimento e proliferação do mesmo numa matriz formada pela solução fotográfica de um ambrótipo contemporâneo, para avaliar o potencial biodeteriorígeno do mesmo. No ensaio de simulação em meio líquido, verificou-se a atividade celulolítica na matriz referida num meio com e sem suplementação de carboximetilcelulose. O isolado fúngico na presença da matriz apresentou valores de atividade celulolítica indicativos não só da capacidade de produção de celulasas neste meio mas também da capacidade de biodegradação/biodeterioração destas matrizes de celulose. Por outro lado, a partir do ensaio em meio sólido, verificou-se o desenvolvimento celular pela observação microscópica de hifas e estruturas reprodutoras que foi indicativo do crescimento celular durante o ensaio. A presença de hifas é indicativa da capacidade de crescimento de fungos filamentosos e por isso do possível envolvimento destes microrganismos na biodeterioração/biodegradação das amostras. Estas estruturas podem comprometer a organização física da espécie fotográfica pela sua capacidade de penetração e dispersão na sua superfície e camadas interiores da mesma. A realização de ensaios de viabilidade celular permitiu comprovar que as células destes microrganismos se encontravam metabolicamente ativas, com capacidade de se desenvolver e proliferar num meio constituído pela solução fotográfica em estudo. Em suma, parece haver um elevado potencial biodeteriorígeno desta estirpe de *Penicillium* sp. sobre estas espécies fotográficas (ambrótipos).

No que diz respeito aos negativos de gelatina, e tal como nos ambrótipos, a fotografia técnica e a microscopia ótica foram a primeira abordagem realizada e através destas foi possível observar detalhadamente a superfície das espécies fotográficas e verificar a presença de algumas degradações tais como riscos, poeiras e sujidades, e a presença de espelho de prata mais pronunciada nas margens dos negativos apesar de serem visíveis em toda a superfície. Para além das degradações verificou-se a presença de retoque fotográfico, tanto no negativo N1 como no N2. A partir das análises por MEV-

EDS verificou-se que a o elemento constituinte maioritário das partículas formadoras de imagem era a prata (Ag), tal como nos ambrótipos, mas ao contrário destes, não foi possível medir a dimensão das partículas; não foi possível distinguir partículas individualmente, estas encontravam-se em aglomerados. O vidro de suporte foi também caracterizado por esta técnica e as análises evidenciaram a presença de elementos como o silício, o cálcio e o sódio; esta composição sugere que o vidro utilizado é um silicato soda-cálcico. Foram analisadas as manchas superficiais em ambos os negativos e nestas verificou-se a presença de elementos como a prata (Ag), o enxofre (S) e cloro (Cl). Tendo em conta a presença das manchas que aparentam ser a típica degradação “espelho de prata”, o enxofre associado à prata pode indicar a presença de Ag_2S , principal responsável por esta patologia, mas a presença de enxofre não é suficiente para concluir acerca da existência de espelho de prata; este elemento pode ser derivado da proteína cisteína ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$), que faz parte da constituição da gelatina ou pode ainda resultar de uma remoção insuficiente de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) que era utilizado como agente fixador. A proveniência do cloro não ficou esclarecida. Este elemento aparece associado a partículas que se distribuem localizadamente e não homogeneamente sobre a superfície, o que torna remota a hipótese deste ter sido utilizado para formar o material fotossensível. Poderia ainda ter origem na utilização de cloreto de mercúrio e amónio (composto utilizado para intensificar a imagem), mas a ausência de elementos como o mercúrio também não permitem concluir acerca desta utilização. A justificação mais provável que se encontra neste caso é o facto de os negativos terem estado expostos a contaminantes ou poluentes com cloro na sua composição e desta forma formar-se o composto cloreto de prata (AgCl) através da reação da prata elementar com cloro gasoso e assim sendo, o AgCl à partida é um produto de processos de degradação. As análises por EDS permitiram ainda detetar a presença de material orgânico relacionado com a matriz das espécies fotográficas. Para complementar a informação obtida por esta técnica foi utilizado $\mu\text{-FT-IR}$ que permitiu detetar bandas relativas à gelatina (3283, 3081, 2938, 1630, 1541 e 1450 cm^{-1}) na superfície não degradada; o que indica a composição da emulsão fotográfica é a gelatina. Também o vidro de suporte foi analisado por $\mu\text{-FT-IR}$ e bandas características da ligação Si-O e Si-O-Si indicam que o vidro tem uma constituição base- SiO_2 , confirmando as análises por EDS. Ainda na amostra N2 foi realizada uma análise da qual se obteve um espectro de FT-IR característico da presença de resina, não sendo possível identificar a classe da mesma. Este resultado é sugestivo de um possível envernizamento da espécie após o final da sua produção. A partir deste técnica não foi possível identificar o material utilizado para o retoque fotográfico. As técnicas de $\mu\text{-Raman}$ e DRX não surtiram resultados conclusivos, facto que esta relacionado com a carga orgânica presente nestas espécies fotográficas, que acabou por mascarar os resultados das análises efetuadas.

Relativamente ao estudo microbiológico; a partir do mesmo isolaram-se duas estirpes fúngicas (*Penicillium* sp. e Micélio) na amostra N1 e duas estirpes de *Penicillium* sp. na amostra N2. No que diz respeito a isolados bacterianos, de N1 isolaram-se duas estirpes de bactérias. De N2 isolaram-se sete estirpes diferentes. Para além da caracterização microbiológica foi desenvolvido um estudo para avaliar o potencial biodeteriorogénico dos isolados bacterianos. Para tal, realizou-se um estudo primário, através de um *screening* para selecionar as bactérias que apresentavam capacidade proteolítica, a partir do qual se selecionaram quatro bactérias. As bactérias selecionadas foram diretamente inoculadas na superfície de um negativo de gelatina contemporâneo (que foi produzido propositadamente para este estudo). A estrutura física e morfológica do negativo foi monitorizada durante quinze dias através de microscopia ótica e de MEV com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano e a influência do mesmo na matriz do negativo. Após observações pelas técnicas referidas foi constatada a cristalização da superfície onde se induziu a contaminação bem com o aparecimento de fendas e destacamentos.

Perspetivas Futuras

- Aprofundar os estudos de microbiologia em relação ao crescimento e desenvolvimento microbiano em substratos constituídos essencialmente por prata para compreender quais os mecanismos utilizados pelos microrganismos de modo manter a sua viabilidade;
- Sequenciar DNA das estirpes fúngicas e bacterianas isoladas nas espécie fotográficas para identificação até à espécie de forma a perceber se a colonização microbiana é muito diversa ou se se restringe a poucas espécies;
- Desenvolver ensaios de simulação de mecanismos de degradação química, como a exposição de espécies fotográficas a condições adversas para compreender quais os processos degradativos mais danosos e quais as maneiras de impedir e/ou reverter os danos causados nos mesmos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrusci, C., Marquina, D., Del Amo, a., Corrales, T., & Catalina, F. (2006). A viscometric study of the biodegradation of photographic gelatin by fungi isolated from cinematographic films. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58(3-4), 142–149. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.011>
- Abrusci, C., Marquina, D., Santos, a., Del Amo, a., Corrales, T., & Catalina, F. (2009). Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by *Sphingomonas paucimobilis* using indirect impedance and chemiluminescence techniques. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(6), 759–764. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.02.012>.
- Abrusci, C., Martín-González, a., Del Amo, a., Corrales, T., & Catalina, F. (2004). Biodegradation of type-B gelatine by bacteria isolated from cinematographic films. A viscometric study. *Polymer Degradation and Stability*, 86(2), 283–291. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.04.024>.
- Albright, G.E. (1977). A tentative method for consolidating gelatin dry plates. *American Institute for Conservation of Historic & Artistic Works*, 7, 36-37.
- Almeida, P., Lannes, S., Calarge, F., Farias, T., Santana, J. (2012). FTIR characterization of gelatin from chicken feet. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 6, 1029 –1032.
- Araújo, J. (2007). Microscopia fotónica. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. Consultado a 13 de Março de 2016 em <<http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm>>.
- Arjunan, V., Subramanian, S., & Mohan, S. (2003). Vibrational Spectroscopic Studies on Trans-1,4-Polychloroprene. *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 423–431.
- Auer, N., Hedger, J. N., & Evans, C. S. (2005). Degradation of nitrocellulose by fungi. *Biodegradation*, 16(3), 229–236. <http://doi.org/10.1007/s10532-004-0896-9>.
- Bahnemann, G. (2012). The preservation of glass plate negatives. Consultado a 16 de Fevereiro de 2016: <https://www.webjunction.org/documents/webjunction/The_Preservation_of_Glass_Plate_Negatives.html>.
- Barger, S., & White, W. (1991). The Daguerreotype Nineteenth-Century Technology and Modern Science. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Bergadi, F. El, Laachari, F., Elabed, S., Mohammed, I. H., & Ibsouda, S. K. (2014). Cellulolytic potential and filter paper activity of fungi isolated from ancient manuscripts from the Medina of Fez. *Annals of Microbiology*, 64(2), 815–822. <http://doi.org/10.1007/s13213-013-0718-6>
- Berthumeyrie, S., Collin, S., Bussiere, P. O., & Therias, S. (2014). Photooxidation of cellulose nitrate: New insights into degradation mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*, 272(2), 137–147. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.02.039>.
- Bittencourt, S. (2008). Microscópio de luz. Laboratório de neurofisiologia. Universidade Federal de São Paulo. Consultado a 13 de Março de 2016 em: <<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/microscopiodeluz.htm>>
- Brodman, B. W., & Devine, M. P. (1981). Microbial Attack of Nitrocellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 26(3), 997–1000. <http://doi.org/10.1002/app.1981.070260322>.

Burgess, N.G. (1858). The photograph and ambrotype manual: A practical treatise on the art of taking positive and negative photographs on paper and glass, commonly known as photography, in all its branches. Trubner & Co (4^{ed}). Nova York: Estados Unidos da América.

Bushong, S.A. (2008). Radiologic Science for Technologists: Physics, Biology and Protection. Mosby, Elsevier (9^{ed}). Consultado a 5 de Junho de 2016: <https://books.google.pt>

Cakić, S., Raskovic, L., Lačnjevac, Č., Rajkovic, M., Barać, M., & Stojanovic, M. (2007). Physical-Mechanical Properties of Nitrodopes Affected by Ultra-Violet Radiation. *Sensors*, 7(10), 2139–2156. <http://doi.org/10.3390/S7102139>.

Carretti, E., Milano, M., Dei, L., & Baglioni, P. (2009). Noninvasive physicochemical characterization of two 19th century English ferrotypes. *Journal of Cultural Heritage*, 10(4), 501–508. <http://doi.org/10.1016/j.culher.2009.02.002>.

Casini, A., Bacci, M., Cucci, C., Lotti, F., Porcianai, S., Picollo, M., Radicatti, B., Poggesi, M., Stefani, L. (2005). Fiber optic reflectance spectroscopy and hyper-spectral image spectroscopy: two integrated techniques for the study of the "Madonna dei Fusi", in *Optical Methods for Arts and Archaeology*, R. Salimbeli & L. Pezzati eds, 5857, 1-8. ISBN: 9780819458575. <http://spie.org/Publications/Proceedings/Volume/5857>

Castro, K., Vandenabeele, P., Rodríguez-Laso, M. D., Moens, L., & Madariaga, J. M. (2005). Improvements in the wallpaper industry during the second half of the 19th century: Micro-Raman spectroscopy analysis of pigmented wallpapers. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(10), 2357–2363. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2005.02.035>

Chen, H. (2014). Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose in *Biotechnology of Lignocellulose*, 510, 1-48. ISBN: 9789400768970.

Ciliberto, E., Gemmellaro, P., Iannuso, V., La Delfa, S., Urso, R. G., & Viscuso, E. (2013). Characterization and Weathering of Motion-picture Films with Support of Cellulose Nitrate, Cellulose Acetate and Polyester. *Procedia Chemistry*, 8(Youth in the Conservation of Cultural Heritage, YOCOCU 2012), 175–184. <http://doi.org/10.1016/j.proche.2013.03.023>

Coleção Jack e Beverlys (2005): <http://brightbytes.com/collection/ambrotypes.html>.

Clark, S. (1998). The conservation of wet collodion negatives. *Studies in conservation*, 43, 231-241.

Credou, J., & Berthelot, T. (2014). Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30), 4767–4767. <http://doi.org/10.1039/C4TB00431K>

Christensen, M. C. (2007). FT-IR Techniques for studying the composition and degradation of Photographic Materials, 1–14.

Curtis, N & Leaist, D. (1998). Interdiffusion of Aqueous Silver Nitrate and Potassium Chromate and the Periodic Precipitation of Silver Chromate Liesegang Bands. *Physical Chemistry* 102(2), 164-176.

Daffner, L.A., Kushel, D., Messinger, J.M. (1996). Investigation of a surface tarnish found on 19th-century daguerreotypes. *Journal of the American Institute for Conservation*. 35(1), 09-21. Consultado a 5 de Junho de 2016: <http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic35-01-002.html>.

- Davidhazy, A. (2002). *Ultraviolet and Infrared Photography Summarized*. Rochester Institute of Technology. Consultado a 12 de Julho de 2016: <<https://people.rit.edu/andpph/text-infrared-ultraviolet.html>>.
- Delor, F., Lacoste, J., Lemaire, J., Barrois-Oudin, N., & Cardinet, C. (1996). Photo- and thermal ageing of polychloroprene: Effect of carbon black and crosslinking. *Polymer Degradation and Stability*, 53(3), 361–369. [http://doi.org/10.1016/0141-3910\(96\)00097-3](http://doi.org/10.1016/0141-3910(96)00097-3)
- Di Pietro, G. (2002). Silver mirroring on silver gelatin Glass Negatives, PhD Dissertation, University of Basel, Switzerland.
- Di Pietro, G. (2007). Exemples of using advanced analytical techniques to investigate the degradation of photographic materials In D. Creagh & D. Bradley (Eds.), *Physical Techniques in the Study of Art, Archaeology and Cultural Heritage* (155-196). Holanda: Elsevier. Consultado a 20 de Agosto de 2016: <https://books.google.pt/>
- Duncan, L. M. (2009). A Technical Study of Five Ruby Ambrotypes, *Art Conservation*, University of Delaware. Consultado a 5 de Junho de 2016: <<http://webcache.googleusercontent.com/>>.
- Kovalenko, V. I., Mukhamadeeva, R. M., Maklakova, L. N., & Gustova, N. G. (1994). Interpretation of the IR spectrum and structure of cellulose nitrate. *Journal of Structural Chemistry*, 34(4), 540–547. <http://doi.org/10.1007/BF00753522>
- Kozlov, P. (1983). The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Albumen*, 24, 651-666. Consultado a 19 de Fevereiro de 2015: <<http://albumen.conservation-us.org/library/c20/kozlov1983.html>>.
- El-Batal, F. H., Khalil, E. M., Hamdy, Y. M., Zidan, H. M., Aziz, M. S., & Abdelghany, a. M. (2010). FTIR spectral analysis of corrosion mechanisms in soda lime silica glasses doped with transition metal oxides. *Silicon*, 2(1), 41–47. <http://doi.org/10.1007/s12633-010-9037-8>.
- Freedman, D. L., Cashwell, J. M., & Kim, B. J. (2000). Biotransformation of Explosive-Grade Nitrocellulose Under Nitrate-Reducing Conditions. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2000(9), 200–210. <http://doi.org/10.2175/193864700784546251>
- Garcia-carreno, F. L., Navarrete, & Del Toro, M. A. (1997). Centro de Investigaciones Biológicas, *Biochemical Education*, 25(3), 161–167.
- Giacomucci, L., Toja, F., Sanmartn, P., Toniolo, L., Prieto, B., Villa, F., & Cappitelli, F. (2012). Degradation of nitrocellulose-based paint by *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 13541. *Biodegradation*, 23(5), 705–716. <http://doi.org/10.1007/s10532-012-9546-9>
- Gillet, M., Garnier, C. e Flieder, F. (1986). Glass Plate Negatives: Preservation and Restoration, *Restaurator*, 7(2), 49-80. DOI: 10.1515/rest.1986.7.2.49.
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. a., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, 2(12), 2046. <http://doi.org/10.1039/c0ay00525h>.
- Grant, M. S. (2000). The Use Of Ultraviolet Induced Visible-Fluorescence In the examination of museum objects , Part II. *Museum*, 1/10(1), 4.

Gratuze, B., & Janssens, K. (2004). Chapter 15 Provenance analysis of glass artefacts. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 42(1), 663–712. [http://doi.org/10.1016/S0166-526X\(04\)80019-9](http://doi.org/10.1016/S0166-526X(04)80019-9).

Harrel, T. (2003). Da pintura rupreste à fotografia. Consultado a 2 de Janeiro de 2016: <<http://www.tharrell.prof.ufu.br/pdfs/A%20Fotografia%20Cap.%20I.pdf>>

Haslego, C (2010). Chemistry of photography. Consultado a 2 de Março de 2016: <<http://www.cheresources.com/content/articles/other-topics/chemistry-of-photography?pg=4>>.

Herbert, A. (2002). Horse in Motion, Eadweard Muybridge. Consultado a 2 de Janeiro de 2016: <http://www.hrc.utexas.edu/exhibitions/permanent/windows/southeast/eadweard_muybridge.html>.

Kapecki, J. (2013). *Color photography*. In Michael Peres (Eds), *The focal encyclopedia of photography*, (4^{ed}) (1-807). Reino Unido: Focal Press.

Kossoy, B. (2014). Fotografia & História. Ateliê Editorial (5ed): São Paulo, Brasil. ISBN: 85-7480-060-0.

Janssens, K & Van Grieken, R. (2004). Non-destructive microanalysis of cultural heritage materials. Amsterdam: Elsevier.

Lavédrine, B. (2007). Positives on glass. In Photographs of the past: Process and Preservation, Tevvy Ball (Ed): The Getty conservation Institute: Los Angeles, California. ISBN: 978-089236-957-7. Consultado a 16 de Fevereiro de 2016: <http://shop.getty.edu/products/photographs-of-the-past-978-0892369577>.

Lee, Y., Peng, Y., & Tomozawa, M. (1997). IR reflection spectroscopy of a soda-lime glass surface during ion-exchange. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 222, 125–130. [http://doi.org/10.1016/S0022-3093\(97\)90104-6](http://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)90104-6).

Leggat, R. (1995). A History of Photography, PhD Dissertation, Oxford, Reino Unido.

López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <http://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>

Lourenço, M. & Sampaio, J. (2007). Microbial deterioration of gelatin emulsions photographs: a case study. *American Institute for Conservation of Historic & Artistic Works*, 12, 19–34.

Matè, D., Pasquariello, G., Selocchi, C. (2008). Biodeterioration of photographic materials, In G. Caneva, M.P. Nugari, O. Salvadori. (Ed.), *Plant Biology for Cultural Heritage* (pp. 160-165). Los Angeles, California: Getty Conservation Institute. ISBN: 978-0-89236-939-3.

Mayo, B., Piekarczyk, T. A., Kowalczyk, M., Pablo, Á., & Bardowski, J. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria*. Blackwell Publishing. ISBN: 978-0-813-81583-1

McElhone, J.P. (1998). Cased photographs including daguerreotypes, ambrotypes and tintypes In *Photographic materials conservation catalog*. Estados Unidos da América: Washington, D.C. Consultado a 23 de Fevereiro de 2016: <http://www.conservation-wiki.com/wiki/PMG_Cased_Photos>.

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Moor, I. (1976). The Ambrotype — Research Into Its Restoration and Conservation —Part 1. *The Paper Conservator*, 1(1), 22–25. <http://doi.org/10.1080/03094227.1976.9638477>
- Mosciaro, C. (2009). Diagnóstico de conservação em coleções fotográficas. Ministério da Cultura: FUNARTE (Caderno Técnico, 6).
- Moura, I., Bursakov, S., Costa, C., & Moura, J. J. (1997). Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe*, 3(5), 279–290. <http://doi.org/DOI: 10.1006/anae.1997.0093>
- Murphy, D. (2001). Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. John Wiley & Sons (Ed): Wiley-Liss. United States of America, Canada. ISBN 0-471-25391-X.
- Neblet, C.B. (1962). The photographic emulsion In *Photography: Its Materials and Processes*, (Ed) (6a): Rochester Institute of Technology, United States of America. Consultado a 13 de Julho de 2016: <https://archive.org/stream/photographyitsma001646mbp/photographyitsma001646mbp_djvu.txt>.
- Nishimura, D. (1993), Sulfiding of Silver Images, *Conservation Distlist Archives*, 7(13). Consultado a 4 de Fevereiro de 2016< <http://cool.conservation-us.org/byform/mailling-lists/cdl/1993/0386.html>>.
- Nwenham, M. (2008). Faded Silver: Non-chemical Intensification of Faded Images on Cellulose Nitrate Motion Picture Film. Consultado a 23 de Fevereiro de 2016: <<http://www.nfsa.gov.au/preservation/research/non-chemical-intensification-of-faded-images/>>
- Osterman, M. (2009). Ambrotype Process: Wet Collodion Positives on Glass. In *Photographic Possibilities*, Robert Hirsch (Ed) (3a): Rochester, Nova York. Consultado a 2 de Fevereiro de 2016. < <http://notesonphotographs.org>>.
- Quye, A., Littlejohn, D., Pethrick, R. a., & Stewart, R. a. (2011). Accelerated ageing to study the degradation of cellulose nitrate museum artefacts. *Polymer Degradation and Stability*, 96(10), 1934–1939. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.06.008>
- Quye, A., Littlejohn, D., Pethrick, R. a., & Stewart, R. a. (2011). Investigation of inherent degradation in cellulose nitrate museum artefacts. *Polymer Degradation and Stability*, 96(7), 1369–1376. <http://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.03.009>
- Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C. Biodeterioration In Cultural Heritage. In *Encyclopedia of Microbiology*, Moselio Schaechter (Ed) (3a): San Diego: Estados Unidos da América. Consultado a 4 de Maio de 2016: <<https://books.google.pt/>>
- Ravines, P., Baum, K. G., Cox, N. a., Welch, S., & Helguera, M. (2014). Multimodality Imaging of Daguerreotypes and Development of a Registration Program for Image Evaluation. *Journal of the American Institute for Conservation*, 53(1), 19–32. <http://doi.org/10.1179/1945233013Y.0000000014>
- Reilly, J., Nishimura, D., Cupriks, K., Adelstein, P. Stability of Black-and-White Photographic Images, with Special Reference to Microfilm. *Abbey Newsletter*, 12(5). <<http://cool.conservation-us.org/byorg/abbey/an/an12/an12-5/an12-507.html>>.

- Ricci, C., Bloxham, S., & Kazarian, S. G. (2007). ATR-FTIR imaging of albumen photographic prints. *Journal of Cultural Heritage*, 8(4), 387–395. <http://doi.org/10.1016/j.culher.2007.07.002>.
- Saretzky, G. (2004). Nineteenth Century New Jersey Photographers An Overview of Professional Photography in New Jersey, 1–67.
- Selwitz, C. (1988). Cellulose nitrate in conservation. *Research in Conservation*. Consultado a 11 de Janeiro de 2016: <<http://books.google.com>>
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of organic compounds*. John Wiley & Sons: Nova Iorque.
- Skoog, A., Holler, F.J., Nieman, A. (2002), *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed.; Bookman.
- Sharma, a, Sundaram, S. T., Zhang, Y.-Z., & Brodman, B. W. (1995). Nitrocellulose degradation by a coculture of *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium solani*. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(1), 1–4. <http://doi.org/10.1007/BF01570005>.
- Smith, G. D. & Clark, J.H. (2004). Raman microscopy in archaeological science, 31,1137 - 1160.
- Stuart, B. (2007). *Analytical techniques in materials conservation*. John Wiley & Sons, Ltd, Inglaterra.
- Parry, D. (2001). Glass plate negatives ate the national museum of Cambodia: Past, Present and Future care of the collection. 1-12
- Pavão, L. (2010). Deterioração – Oxidação da prata. Consultado a 31 de Maio de 2016: <http://www.lupa.com.pt/site/index2.php?cont_=ver2&id=325&tem=169>.
- Pereira, C. (2010). O retoque do negativo fotográfico: estudo de uma colecção do Arquivo Fotográfico da Câmara Municipal de Lisboa TT - Retouching of photographic negatives: study of a collection at Arquivo Fotográfico da Câmara Municipal de Lisboa. *Estudos de Conservação E Restauro*, (2), 38–57.
- Petherbrige, G. (1987) Modern Records In G. Pheterbridge (Ed.), *Conservation of Library and Archive Materials and the Graphic Arts* (267-297). England: Butterworths. Consultado a 22 de Agosto de 2016: <https://books.google.pt>>.
- Pfeil, A. (1999). Microbial Degradation of Nitrocellulose in a Composting Environment. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 24(3), 156–158. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4087\(199906\)24:03<156::AID-PREP156>3.0.CO;2-C](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4087(199906)24:03<156::AID-PREP156>3.0.CO;2-C).
- Pušárová, A., Bučková, M., Habalová, B., Kraková, L., Maková, A., & Pangallo, D. (2016). Microbial communities affecting albumen photography heritage: a methodological survey. *Scientific Reports*, 6, 1-14. <http://doi.org/10.1038/srep20810>.
- Rosado, T., Martins, M. R., Pires, M., Mirão, J., Candeias, A., Caldeira, A. T. (2013). Enzymatic Monitorization of Mural Paintings Biodegradation and Biodeterioration. *International Journal of Conservation Science*, 4, 603-612.
- Tarasova, N. B., Petrova, O. E., Davydova, M. N., Khairutdinov, B. I., & Klochkov, V. V. (2004). Changes in the nitrocellulose molecule induced by sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*

desulfuricans 1388. The enzymes participating in this process. *Biochemistry (Moscow)*, 69(7), 809–812. <http://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000040208.67569.d1>

Towler, J. (1864). The silver sunbeam: A practical and theoretical text-book. In *Sun Drawing and Photographic Printing: comprehending all the wet and dry process*, J. Ladd ed, 60, 1-390. Consultado a 11 de Fevereiro de 2015: <<http://albumen.conservation-us.org/library/monographs/sunbeam/chap09.html>>.

Towler, J. (1974). Dry collodion process In *The silver sunbeam* Morgan and Morgan, Inc., Hastings-on-Hudson 2ed, Rochester: Nova York. Consultado a 11 de Fevereiro de 2015: <<http://albumen.conservation-us.org/library/monographs/sunbeam/chap36.html>>.

Triarhou, L. C., & del Cerro, M. (2008). The structure of Lippmann heliochromes: Cajal and the 1908 Nobel Prize in Physics. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.08.006>.

Valverde, M. (2005). Photographic negatives: nature and evolution of processes, 9–18. Consultado a 4 de Janeiro de 2016: <<http://www.bcin.ca/Interface/openbcin.cgi?submit=submit&Chinkey=235796>>.

Vivar, I., Borrego, S., Ellis, G., Moreno, D. & Garcia, M. (2013). Fungal biodeterioration of color cinematographic films of the cultural heritage of Cuba. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 372–382. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.021>

Weaver, G. (2005). Deterioration of fiber-base gelatin silver prints. Consultado a 13 de Julho de 2016: <http://notesonphotographs.org/index.php?title=Weaver,_Gawain._%22Deterioration_of_Fiber-base_Gelatin_Silver_Prints%22#Gelatin_Silver_Print_Deterioration>.

Whitman, K. (2007). The history and conservation of glass supported and protected photographs. Consultado a 14 de Fevereiro de 2016: <http://notesonphotographs.org/index.php?title=Whitman,_Katharine._%22The_History_and_Conservation_of_Glass_Supported_and_Protected_Photos%22#Part_1._History_of_photographic_processes_on_glass>.

Williams R. & Williams G. (1994) The invisible image – a tutorial on photography with invisible radiation, Part 2: Fluorescence photography. *Journal of Biological Photography*, 62, 3-19.

ANEXOS

ANEXO I – Composição dos meios de cultura**Meios de cultura sólidos****✓ Malte Extrato Agar (MEA) 2% g L⁻¹ utilizado para o crescimento de fungos**

- 20 g extrato de malte
- 1 g peptona
- 20 g glucose
- 20 g agar bacteriológico

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ Rosa de Bengale com Cloranfenicol (CBR), meio com antibiótico utilizado para o crescimento de fungos

- 5 g de peptona
- 1 g hidrogenofosfato dipotássico
- 0.5 g sulfato de magnésio
- 0.05 g rosa de Bengala
- 0.1 g cloranfenicol
- 15.5 g agar

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ Nutriente Agar (NA) utilizado para o crescimento de bactérias

- 5 g peptona
- 5 g cloreto de sódio
- 1.5 g extrato de carne
- 15 g agar

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ Agar triptona de soja (TSA) utilizado para o crescimento de bactérias

- 15 g peptona de caseína
- 5 g peptona de farinha de soja
- 5 g cloreto de sódio
- 15 g agar

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ Extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) para crescimento de fungos

- 15 g extrato de levedura
- 10 g peptona

- 5 g glucose
- 20 g agar

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ **Milk 1 (M1) para *screening* de atividade proteolítica** (adaptado de Adinarayana *et al.* 2003)

- 1 g peptona
- 5 g cloreto de sódio (NaCl)
- 20 g agar
- 13 g de leite em pó

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ **Milk 2 (M2) para *screening* de atividade proteolítica (sigma 80957)**

- 1 g peptona de caseína
- 1 g glucose
- 20 g agar
- 1 g de leite em pó
- 2,5 g extrato de levedura

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ **RBM3 para *screening* de atividade proteolítica (sigma 80957)**

- 1 g peptona
- 5 g cloreto de sódio (NaCl)
- 20 g agar
- 8 mL de emulsão comercial RBM3

Dissolver os reagentes em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

Meios de cultura líquidos

✓ **Meio Basal com carboximetilcelulose (CMC)**

- 100 mL solução de sais (preparada anteriormente)
- 10 mL CSL
- 5 g CMC
- 5 g xilano
- 2 mL tween 80
- 0.3 g ureia

Perfazer o volume de 1000 mL com água destilada. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ **Meio Basal sem carboximetilcelulose (CMC)**

- 100 mL solução de sais (preparada anteriormente)
- 10 mL CSL
- 5 g xilano
- 2 mL tween 80
- 0.3 g ureia

Perfazer o volume de 1000 mL com água destilada. Levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

Composição e preparação de reagentes

✓ **Solução *stock* de sais**

- 0.17 g cloreto de cobalto hexahidratado
- 1.0 g cloreto de cobre pentahidratado
- 10.0 g hidrogenofosfato de potássio
- 1.0 g/10 mL H₂O de extrato de levedura

Acertar o pH a 7 e levar à autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm.

✓ **Tampão citrato 0.005 M, pH 4.8**

Reagentes: ácido cítrico 0.1 M e citrato de sódio 0.1 M

Ácido cítrico 0.1 M

Dissolver 10.507 g de ácido cítrico (C₆H₈O₇.H₂O) num balão volumétrico de 500 mL. Perfazer o volume com água destilada.

Citrato de sódio 0.1 M

Dissolver 14.705 g de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) num balão volumétrico de 500 mL. Perfazer o volume de 500 mL com água destilada.

Solução tampão

Adicionar num balão de erlenmeyer 230 mL de ácido cítrico 0.1 M e 270 mL de citrato de sódio 0.1 M. Perfazer o volume de 1000 mL, num balão volumétrico, com água destilada.

✓ **Ácido dinitrosalicílico – DNS (1000 mL)**

Dissolver 10 g de ácido 3.5-dinitrosalicílico em 200 mL de NaOH 2M (16 g/200 mL) com aquecimento e agitação. Dissolver 300 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado em

500 mL de água destilada. Misturar as duas soluções e perfazer o volume a 1000 mL com água destilada.

✓ **Azul de Comassie G 0.06 % p/v (100 mL)**

- 0.06 g de azul de comassie G
- HCl 0.6 N: medir 4.92 mL HCl/100mL

Dissolver 0.06 g de azul de comassie G em 4.92 mL de HCl. Perfazer o volume de 100 mL com água destilada. Colocar em agitação até dissolução completa.

✓ **Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)**

- 25 mg de azul MTT
- 50 mL de PBS

Dissolver 25 mg de reagente MTT em 50 mL de tampão fosfato salino (PBS). Colocar em agitação até dissolução completa (4-6 horas). Filtrar com filtro de seringa de 0.2 µm e colocar no frio.

ANEXO II – Micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μ -FT-IR)

Para uma interpretação mais adequada dos espectros de μ -FT-IR apresentados na seção dos resultados (cf. 3.1.4. e 3.3.4), foram utilizados espectros da base de dados online IRUG que se encontram aqui apresentados para termo de comparação.

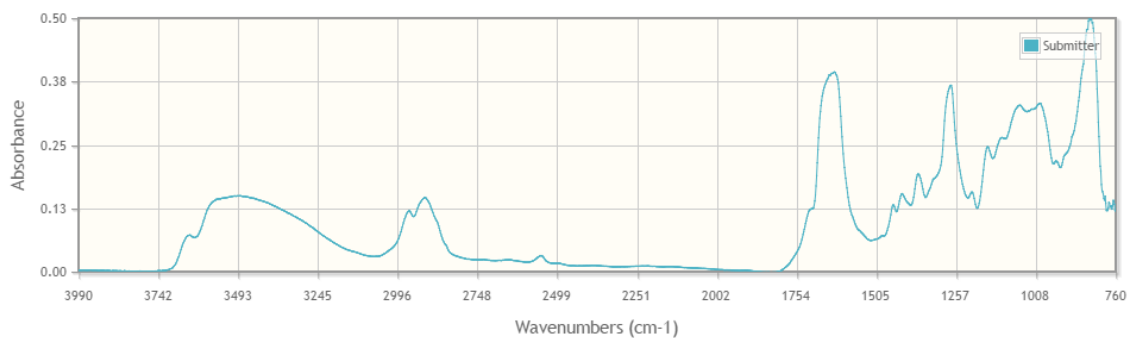


Figura II.1. Espectro de absorção do nitrato de celulose.

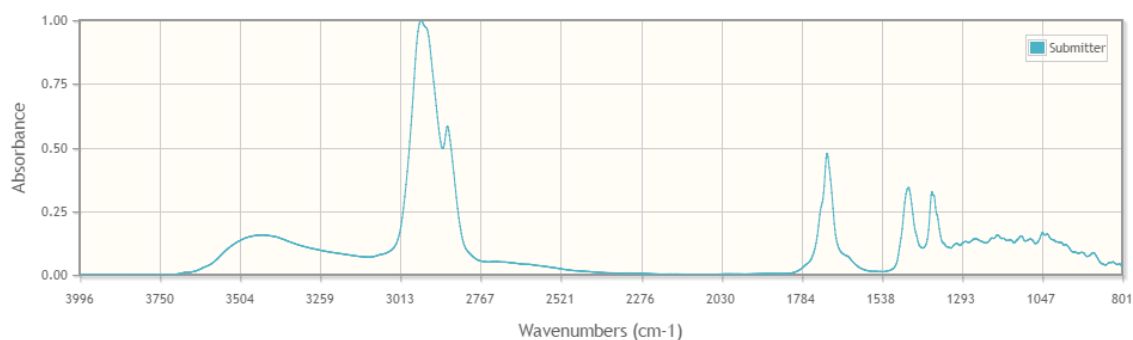


Figura II.2. Espectro de absorção da resina natural triterpénica damar.

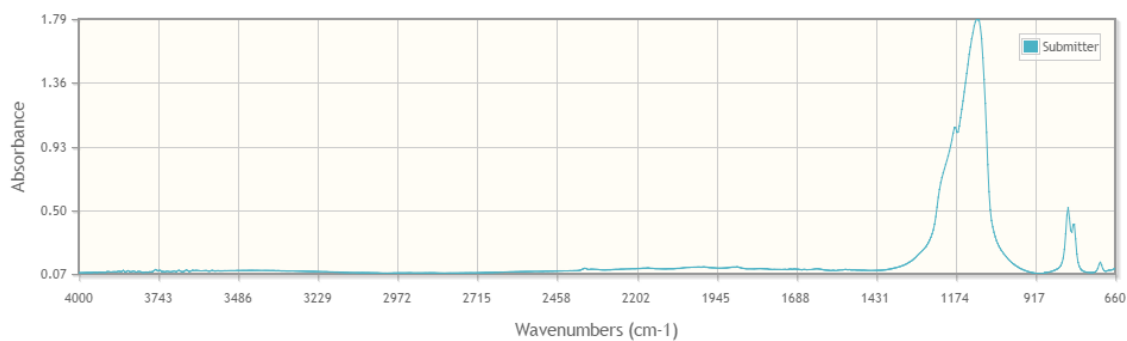


Figura II.3. Espectro de absorção da sílica.

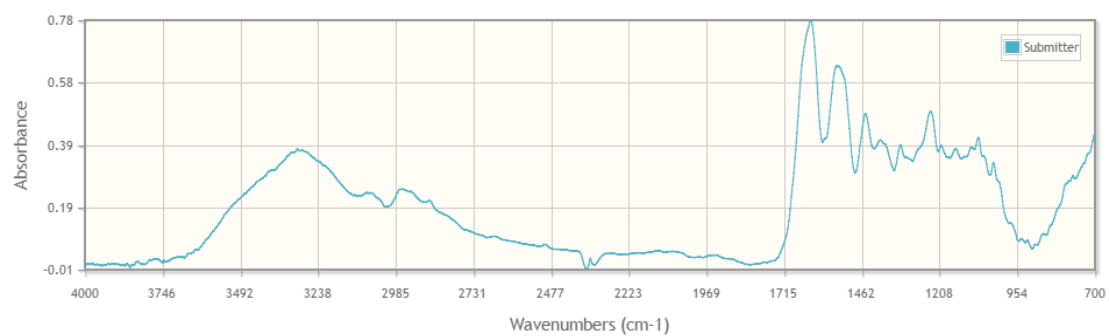


Figura II.4. Espectro de absorção da gelatina.

ANEXO III – Micro-espectroscopia de Raman (μ -Raman)

A interpretação dos espectros de μ -Raman obtidos a partir da análise das amostras foi realizada a partir da comparação deste com os espectros obtidos de análises realizadas a padrões propositalmente adquiridos para este estudo. Os padrões adquiridos foram o sulfureto de prata (Ag_2S) e cloreto de prata (AgCl). Nas figuras III.1 e 2 são apresentados os espectros respectivos e na figura III.3 apresenta-se o espectro da fotodecomposição de Ag_2S .

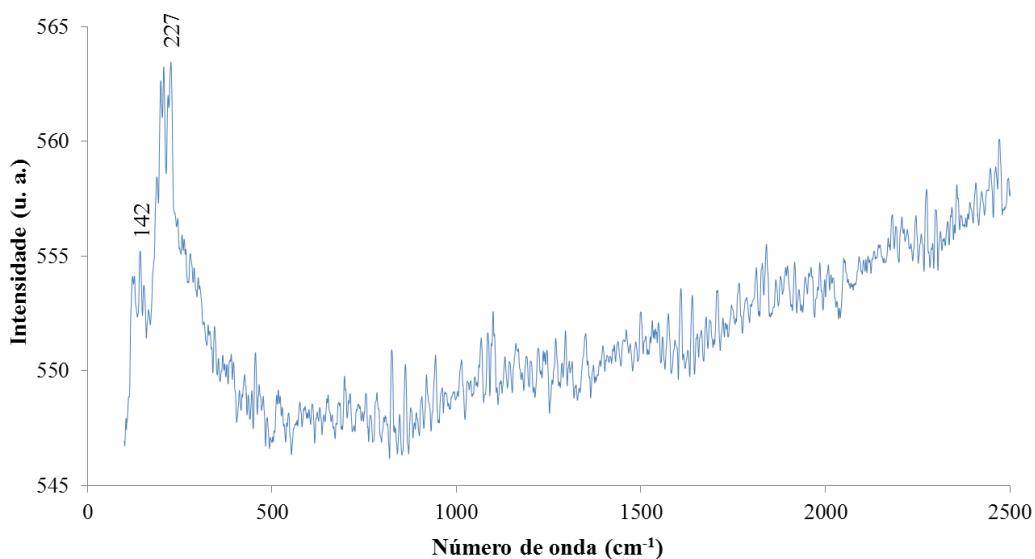


Figura III.1. Espectro de μ -Raman de Ag_2S .

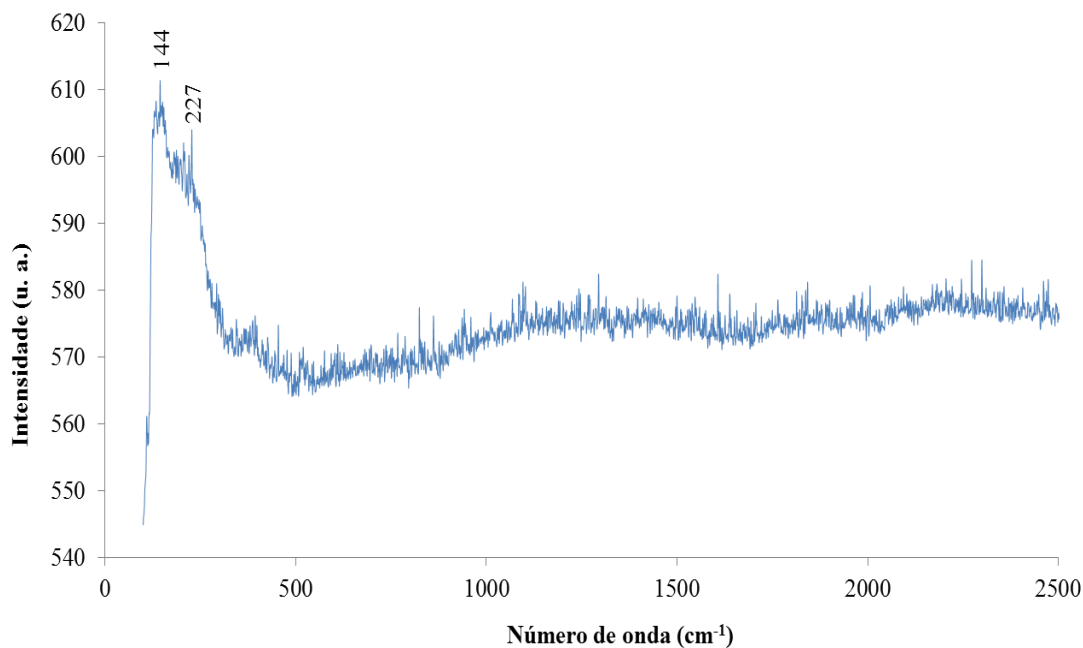


Figura III.2. Espectro de μ -Raman de AgCl .

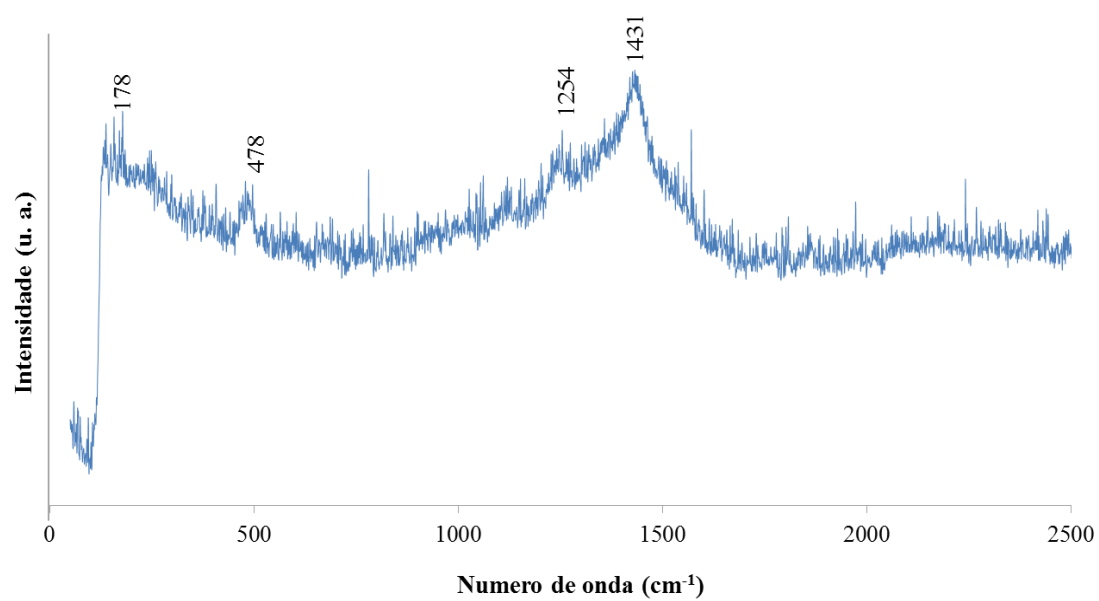


Figura III.3. Espectro de μ -Raman com bandas características da fotodecomposição de Ag_2S .

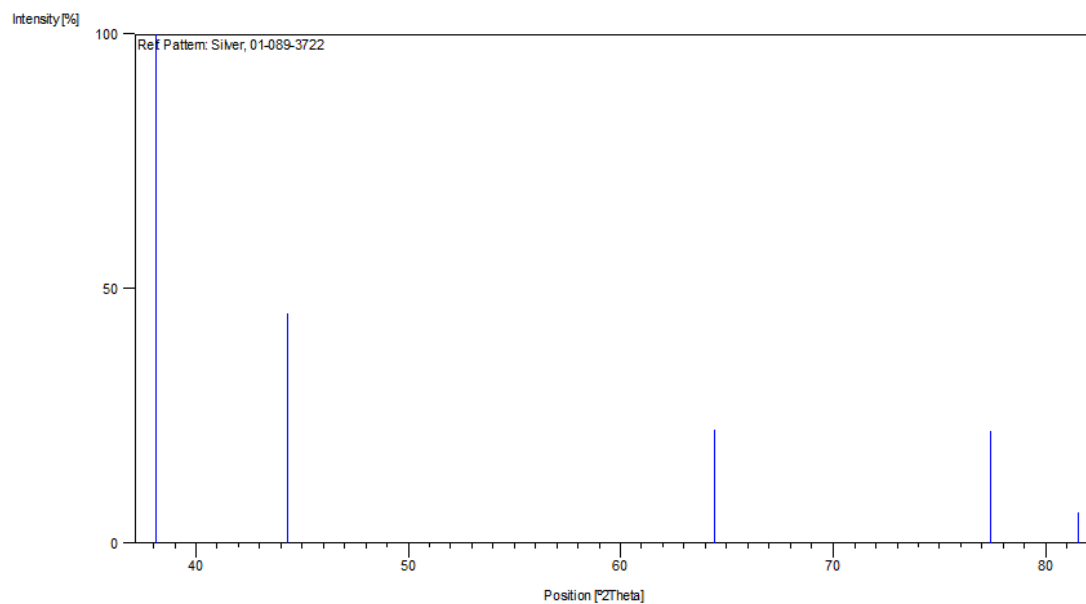
ANEXO IV – Micro-difração de raios-X

Figura IV.1. Padrão DRX de prata (Ag); ficha ICDD 01-089-3722.

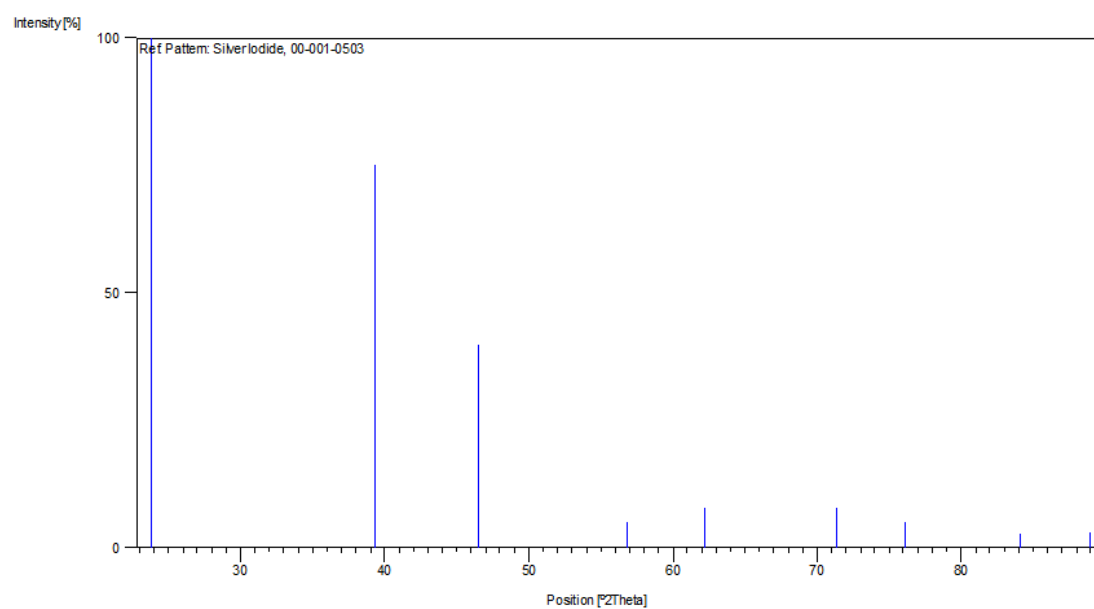


Figura IV.2. Padrão DRX de prata (AgI); ficha ICDD 00-001-0503.

ANEXO V – Caracterização por MEV-EDS do separador metálico da amostra A1

A Figura V.1. corresponde a análises por MEV-EDS que indicam que separador metálico de A1 é constituído por cobre e zinco.

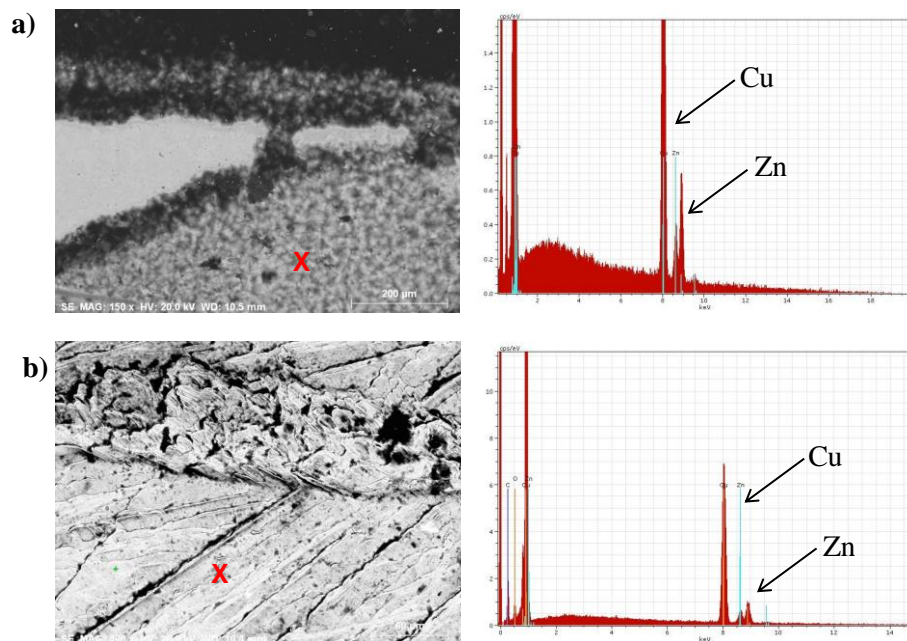


Figura V.1. Imagens de MEV e respetivas análises pontuais elementares onde se verifica a composição química elementar do separador metálico de A1: a) área da frente do separador; b) área do verso do separador

ANEXO VI – Avaliação do potencial biodeteriorogénico de fungos filamentosos

Para a avaliação do potencial biodeteriorogénico do fungo A5_4v (*Penicillium* sp.4) elaborou-se a curva de calibração da D-Glucose e de BSA (albumina sérica bovina).

A Tabela VI.1 e a Fig. VI.1 correspondem aos valores e à curva de calibração da D-glucose, respetivamente, que foi utilizada como padrão na determinação da atividade enzimática da celulase.

Tabela VI.1. Valores da solução padrão da glucose com concentrações entre 0 e 1000 mg. L⁻¹ e medição da absorvância a 540 nm.

Padrão	[D-Glucose] mg.L ⁻¹	A (540 nm)						Média	Desvio Padrão
1	0	0.003	0.001	0.001	0.003	0.005	0.003	0.0023	0.0015
2	50	0.014	0.012	0.012	0.012	0.014	0.014	0.0130	0.0011
3	100	0.047	0.046	0.045	0.05	0.053	0.053	0.0490	0.0035
4	150	0.073	0.067	0.072	0.069	0.069	0.067	0.0695	0.0025
5	200	0.109	0.109	0.111	0.097	0.102	0.109	0.1062	0.0055
6	400	0.239	0.245	0.244	0.241	0.241	0.244	0.2423	0.0023
7	600	0.387	0.388	0.379	0.382	0.382	0.387	0.3842	0.0037
8	800	0.504	0.503	0.549	0.54	0.542	0.54	0.5297	0.0205
9	1000	0.631	0.612	0.637	0.631	0.629	0.629	0.6282	0.0084

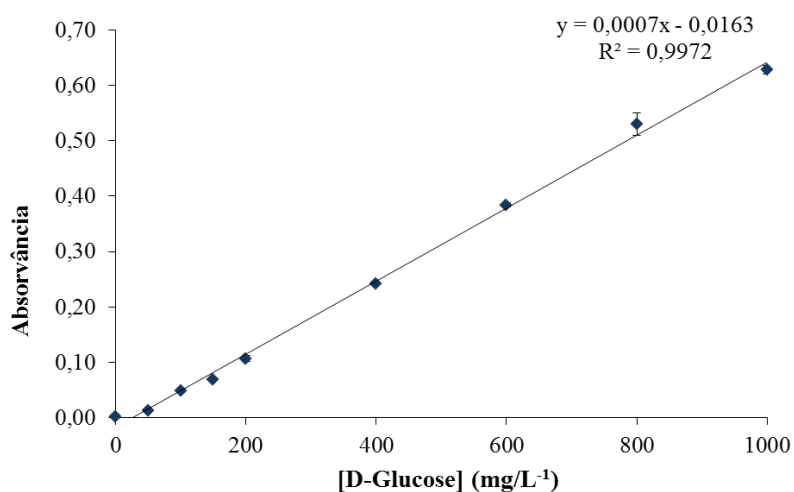


Figura VI.1. Curva de calibração da D-Glucose

A Tabela VI.2 e Figura VI.2. correspondem aos valores e à curva de calibração do BSA (albumina sérica bovina), respectivamente, e foi utilizada como padrão na determinação da atividade específica da celulase.

Tabela VI.2. Valores da solução DE bsa concentrações entre 0 e 60 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e medição da absorvância a 540 nm.

Padrão	[BSA] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	A (590 nm)			A – branco			Média (A- branco)	Desvio Padrão
1	0	0,1840	0,1844	0,1841	0,0015	0,0019	0,0016	0,0018	0,0002082
2	1	0,2068	0,2068	0,2062	0,0243	0,0243	0,0237	0,0241	0,0003464
3	2	0,2090	0,2092	0,2089	0,0265	0,0267	0,0264	0,0266	0,0001528
4	5	0,2350	0,2354	0,2350	0,0525	0,0529	0,0525	0,0527	0,0001155
5	10	0,2870	0,2869	0,2865	0,1045	0,1044	0,1040	0,1043	0,0002646
6	15	0,3100	0,3098	0,3098	0,1275	0,1273	0,1273	0,1274	0,0050807
7	20	0,3350	0,3160	0,3220	0,1525	0,1335	0,1395	0,1419	0,0097125
8	40	0,4130	0,3880	0,3910	0,2305	0,2055	0,2085	0,2149	0,0136504
9	60	0,4480	0,4430	0,4730	0,2655	0,2605	0,2905	0,2722	0,0160728

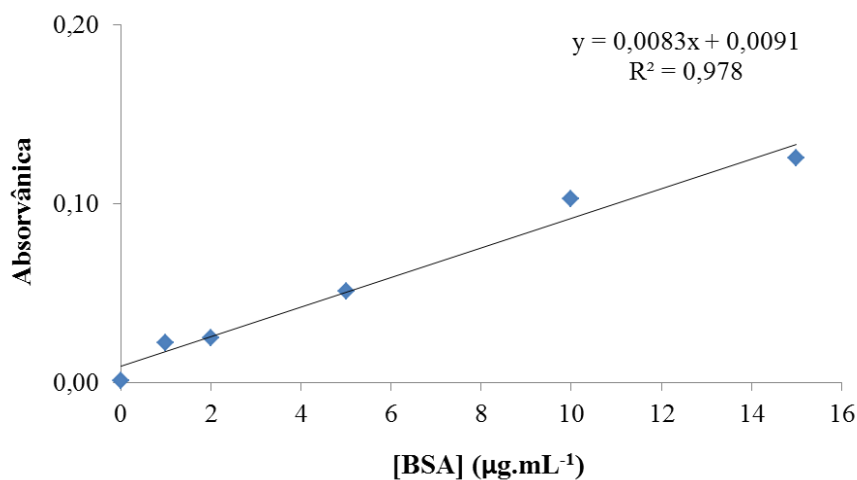


Figura VI.2. Curva de calibração da BSA.

Nas Tabela VI.3 e VI.4. é apresentado o teste de análise de variância (ANOVA) relativa à determinação de atividade celulolítica dos isolados fúngicos de A1 e relativa às 168 horas da determinação da atividade celulolítica do ensaio de simulação em meio líquido, respetivamente.

Tabela VI.3. Tabela ANOVA relativa à determinação da atividade celulolítica dos isolados fúngicos provenientes de A1.

ANOVA						
		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95%)
A2_3b <i>Penicillium</i> spp.1	Entre grupos	83,825	6	13,971	80,793	,000
	Dentro dos grupos	6,052	35	,173		
	Total	89,877	41			
A4_1 <i>Penicillium</i> spp.2	Entre grupos	,200	6	,033	204,000	,000
	Dentro dos grupos	,006	35	,000		
	Total	,206	41			
A4_4 <i>Penicillium</i> spp.3	Entre grupos	,240	6	,040	90,490	,000
	Dentro dos grupos	,015	35	,000		
	Total	,255	41			
A5_1b Micélio	Entre grupos	,792	6	,132	53,592	,000
	Dentro dos grupos	,086	35	,002		
	Total	,878	41			
A5_4v <i>Penicillium</i> spp.4	Entre grupos	1,875	6	,312	103,589	,000
	Dentro dos grupos	,106	35	,003		
	Total	1,980	41			
A6_1 <i>Ulocladium</i> spp.1	Entre grupos	,833	6	,139	50,024	,000
	Dentro dos grupos	,097	35	,003		
	Total	,930	41			
A6_4b <i>Penicillium</i> spp.4	Entre grupos	,624	6	,104	142,797	,000
	Dentro dos grupos	,025	35	,001		
	Total	,650	41			
<i>Trichoderma harzanium</i>	Entre grupos	19,002	6	3,167	254,383	,000
	Dentro dos grupos	,436	35	,012		
	Total	19,438	41			

Tabela VI.4. Tabela ANOVA relativa às 168 horas da determinação da atividade celulolítica do ensaio de simulação em meio líquido.

ANOVA					
168 horas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Entre grupos	,038	3	,013	31,637	,000
Dentro dos grupos	,005	12	,000		
Total	,042	15			

A Figura VI.3. corresponder ao gráfico padrão da atividade de MTT para suspensões celulares de A_{5_1v}.

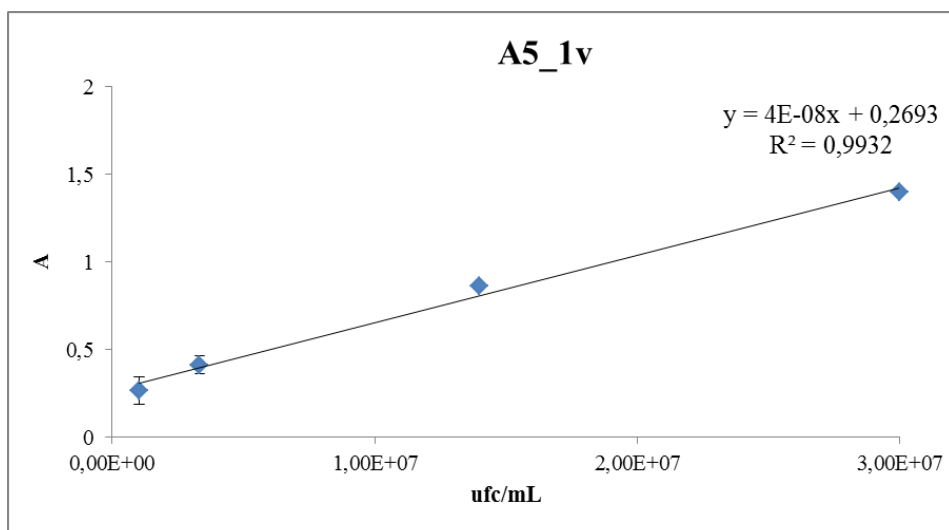


Figura VI.3. Atividade MTT (Abs 570 nm) para suspensões celulares de A_{5_1v}.